Aus dem Physiologischen Institut
Lehrstuhl für Klinische Physiologie
(Direktor: Prof. Dr. R. Kaufmann)
der Universität Düsseldorf

Zellelektrophoretische Messungen mittels Laser-Doppler-Spektroskopie zur Charakterisierung weißer Blutzellen

Möglichkeiten und Grenzen für den klinisch-diagnostischen Einsatz

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
vorgelegt von
Oliver Ottmann

1984

UNIV.
LIBRARY
NSL

Aus dem Physiologischen Institut
Lehrstuhl für klinische Physiologie
(Direktor: Prof. Dr. R. Kaufmann)
der Universität Düsseldorf

ZELLELEKTROPHORETISCHE MESSUNGEN MITTELS LASER-DOPPLER-SPEKTROSKOPIE ZUR CHARAKTERISIERUNG WEISSER BLUTZELLEN: Möglichkeiten und Grenzen für den klinisch-diagnostischen Einsatz

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Oliver Ottmann

1984

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MESSMETHODE UND APPARATIVER AUFBAU	7
3.	METHODIK DER ZELLPRÄPARATION	
3.1	Zellsuspensionen	9
3.2	Lymphozyten	9
3.3	Mitogen-Stimulation von Lymphozyten	10
3.4	Thymozyten	12
3.5	Myeloische Zellen	12
3.5.1	Granulozyten	12
3.5.2	Granulopoetische Vorstufen	13
3.6	Immunologische Zelltypisierung	14
4.	PATIENTEN UND PROBANDEN	16
5.	ERGEBNISSE	
5.1	Periphere Lymphozyten hämatologisch gesunder Personen	18
5.2	Periphere Lymphozyten bei 16 Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL)	24
5.2.1	Mobilitätsmessungen	24
5.2.2	Immunologische Typisierung	27
5.2.3	Typisierungsergebnisse und elektrophoretische Mobilität	32
5.3	Thymozyten	33
5.4	Mitogen-Stimulation von Lymphozyten	35
5.5	Myeloische Zellreihe	38
5.5.1	Granulozyten und granulopoetische Vorläuferzellen	38
5.5.2	Myeloblasten bei akuter myeloischer Leukämie (AML)	43

Seite

6.	DISKUSSION	
6.1	Periphere Lymphozyten hämatologisch gesunder Personen	44
6.2	Chronisch lymphatische Leukämie (CLL)	47
6.2.1	Klinische Grundlagen	47
6.2.2	Immunologische Charakteristika	48
6.2.3	Bisherige elektrokinetische Untersuchungen	49
6.2.4	Interpretation der Versuchsergebnisse	50
6.3	Thymozyten	54
6.4	Mitogen-Stimulation von Lymphozyten	56
6.5	Myeloische Zellreihe	58
6.5.1	Granulozyten und granulopoetische Vorläuferzellen	58
6.5.2	Myeloblasten bei akuter myeloischer Leukämie (AML)	59
7.	ZUSAMMENFASSUNG	60
8.	LITERATURVERZEICHNIS	63

1. EINLEITUNG

Differenzierte Zellen werden charakterisiert anhand ihrer zelltypspezifischen Funktionen, ihrer histomorphologischen und ultrastrukturellen Besonderheiten. Die Unterscheidung von verschiedenen Populationen und Subpopulationen, z.B. im lymphatischen System, die Analyse diskreter Differenzierungsstufen in der Ontogenese der einzelnen Zellreihen und die Klassifizierung neoplastischer Zellen ist mit konventionellen Techniken allein mitunter nicht möglich. Dies gilt in besonderem Maße für lymphatische Neoplasien (Magrath, 1981) und generell auch für akute Leukämien, bei denen in Unkenntnis der Stammzellenmorphologie die Zuordnung zu einer bestimmten Zellinie und präzis definierten Differenzierungsstufe sehr schwierig sein kann (Greaves, 1975). Als präzise Identifikationsmerkmale auf molekularer Ebene sind denkbar:
a) Strukturgene, welche spezifische Stoffwechselprodukte der Zellen kodieren, b) diese Stoffwechselprodukte selbst und die für ihre Synthese notwendige Enzymausstattung und c) zelluläre Oberflächenstrukturen die durch Vermittlung interzellulärer Signale die zellspezifischen Funktionen regulieren.
Während die Grundstruktur der Zellmembranen entsprechend dem "Fluid Mosaik Modell" (Singer und Nicolson, 1972) nur wenig divergiert, sind dennoch bei verschiedenen Zelltypen erhebliche kompositionelle Unterschiede möglich. Diese betreffen das Protein zu Lipid Verhältnis, membranständige Enzymaktivitäten, sowie Proteine und Glykoproteine mit Rezeptorfunktion, welche die antigenen Eigenschaften der Zellen determinieren.
Bedeutende Unterschiede des biologischen Verhaltens normaler und maligner Zellen können mit Alterationen der Zelloberfläche korreliert werden. Die maligne Transformation der Zellen wird z.B. begleitet vom Verlust der (Glykokalix-vermittelten) Kontaktinhibition, einer verminderten

Oberflächenadhäsion, einem geänderten Membrantransport bestimmter Moleküle und Abweichungen im Glykolipid-, Glykoprotein- und Neuraminsäuregehalt (Berlin et al., 1975).

In Kenntnis dieser Unterschiede hat die Analyse von Oberflächenstrukturen in den letzten Jahren eine große Bedeutung erlangt, wobei besonders monoklonale Antikörper gegen spezifische Membranrezeptoren und antigene Determinanten zu einem wichtigen immunologischen Werkzeug geworden sind (Bowman und Mauer, 1981). Bisher am besten untersucht sind das lymphatische System, Lymphome und lymphatische Leukämien, Gebiete auf denen die Oberflächenmarker-Studien in therapeutischer und prognostischer Hinsicht relevant sind (Aisenberg, 1981). Es muß jedoch hervorgehoben werden, daß keine der bisher gefundenen "Marker" erkrankungsspezifisch, sondern vielmehr Ausdruck der Differenzierung oder funktionellen Aktivität der Zellen sind (Bowman et al.,1980; Greaves et al.,1981). Zusätzlich zu diesen hoch-selektiven Markern korrelieren auch unspezifischere Eigenschaften der Zellmembran wie die Oberflächenladung mit der Funktion, biologischen Verhaltensweisen und anderen Charakteristika der Zellen. Hierzu gehören z.B. zelluläre Kontaktphänomene während der Embryogenese (Schaeffer et al., 1973), Zellaggregation und Zelladhäsion (Grinell, 1976; Nicolson et al., 1976), das Migrationsverhalten von Lymphozyten (Wiig, 1976), ferner Tumoreigenschaften wie lokele Invasivität und Metastasierungstendenz (Hagmar, 1972; Bossmann et al., 1973).

Eine Methode zur Ermittlung der chemischen Eigenschaften und Struktur der molekularen Bausteine der Zellmembran die solche oberflächenabhängigen biologischen Phänomene bedingen, besteht in der Messung der Oberflächenladung der Zellen. Durch Kombination von gezielten chemischen Alterationen der Zellmembran und Messung der resultierenden Oberflächenladungsänderungen wurde die Anwesenheit verschiedener chemischer Gruppen nachgewiesen und ihr relativer Anteil an der Gesamtladung der Zellen abgeschätzt (Mehrishi, 1972). Die Zell-

elektrophorese hat sich hierbei als ein zweckmäßiges Verfahren erwiesen, die Messung wird an vitalen, in physiologischem Milieu suspendierten Zellen durchgeführt. Die am besten untersuchten Zellen sind Erythrozyten und Leukozyten, bei letzteren vor allem die Lymphozyten.

Mindestens 5 verschiedene ionisierbare Gruppen auf der Oberfläche menschlicher Lymphozyten tragen zur elektrokinetischen Gesamtladung der Zellen bei: Amino- und Sulfhydrylgruppen, die Carboxylgruppen der N - Acetylneuraminsäure (NANA), Ribonuklease-empfindliche Phosphatgruppen und nicht identifizierte schwach-saure Gruppen (Mehrishi und Zeiller, 1974).

Menschliche Leukozyten besitzen bei einem pH von 7.2 und einer physiologischen Ionenstärke des Elektrophoresemediums eine negative Nettoladung und wandern dementsprechend in Richtung der Anode (Thomson und Mehrishi, 1969), wobei die α - Carboxylgruppen der NANA und die Phosphatgruppen einen zwar wesentlichen Anteil an der negativen Gesamtladung haben (Mayhew und Weiss,1968; Vassar et al.,1969; Lichtman und Weed, 1970), jedoch einen geringeren Beitrag leisten als die bislang nicht identifizierten sauren Gruppen (Mehrishi und Zeiller, 1974).
Deutliche Ladungsunterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen sind beispielsweise an T - und B - Lymphozyten nachgewiesen worden (Wiig und Thunold, 1973), wobei die niedrigere negative Ladung der B-Lymphozyten unter anderem auf eine geringere Zahl von α - Carboxylgruppen der NANA und eine höhere Dichte der positiven SH- und Aminogruppen zurückgeführt wurde (Mehrishi und Zeiller, 1974). Inwieweit die hohe Dichte von Oberflächenimmunglobulinen auf B-Lymphozyten für die stärkere Präsenz von SH- und Aminogruppen im Vergleich zu T-Lymphozyten verantwortlich ist und welchen Anteil sie an der Gesamtzelladung haben ist nicht endgültig geklärt. Jedoch demonstrierten Zeiller et al.(1976) an Milzzellen der Maus, daß die Elimination der Oberflächenimmunglobuline von B-Lymphozyten unter capping-Bedingungen zu einer Mobilitätszunahme

führt, die bei Reexpression der Oberflächenimmunglobuline reversibel ist.

Während mehrere Untersucher, welche die elektrophoretischen Mobilitätsunterschiede zwischen T - und B - Lymphozyten bestätigten, eine deutlich zweigipflige Mobilitätsverteilung beobachteten (Sabolovic´et al.,1972; Donald und Hutchinson, 1974; Chollet et al.,1976), wurden auch davon abweichende Versuchsergebnisse veröffentlicht, die bei routinemäßigen elektrophoretischen Messungen peripherer Lymphozyten eine Normalverteilung (Ruhenstroth-Bauer, 1965) oder eine eingipflig-asymmetrische Mobilitätsverteilung (Wiig und Thunold,1973; Smith et al.,1976) erkennen ließen.
Die zusätzliche Differenzierungsmöglichkeit zwischen Subpopulationen von T-Lymphozyten aufgrund unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität (EPM) (Kaplan und Uzgiris,1976; Serrou et al.,1977),sowie die Existenz einer dritten, elektrophoretisch abgrenzbaren Lymphozytenpopulation ohne erkennbare B - oder T - Zell Marker (Chollet et al., 1977) sind beschrieben worden. Vassar et al.(1976) beobachteten dagegen eine erhebliche inter- und intraindividuelle Variabilität der Lymphozytenmobilitäten, die den Wert der EPM zur Charakterisierung von Lymphozytenpopulationen bezweifeln läßt. Demgegenüber wurde eine Separation von Leukozyten und einzelnen Lymphozytenpopulationen mittels präparativer Zellelektrophorese erzielt (Stein, 1975).

Verschiedene B-Zell Subpopulationen sollen sich in ihren elektrokinetischen Eigenschaften voneinander unterscheiden (Dumont et al., 1979), doch liegen für den Menschen praktisch keine Ergebnisse vor.

Die Diskrepanz zwischen diesen Resultaten dürfte vorwiegend auf methodische Probleme zurückzuführen sein, die bei der Lymphozytenisolierung und der elektrophoretischen Messung auftreten.

Zellverluste selektiver und nicht-selektiver Art können bei allen gegenwärtig eingesetzten Leukozytenseparationsverfahren auftreten (Brown und Greaves, 1974) und stellen einen Störfaktor dar bei allen quantifizierenden immunologischen Untersuchungen an Blutzellen, der aber z.Zt. nicht zu eliminieren ist.

Dagegen richtet sich die Kritik an der Meßtechnik gegen die bei den meisten Versuchen verwendeten manuellen Zytopherometer, die wegen ihrer zeitaufwendigen Messungen mit Stoppuhr und Mikroskop die Beurteilung nur kleiner Zellzahlen bei erheblicher subjektiver Beeinflussung durch den Untersucher erlauben (Hoffmann et al., 1979).

Eine wesentliche Verbesserung der Methodik bestand in der Entwicklung automatischer, auf dem Prinzip der Laser Doppler Spektroskopie beruhenden Zytopherometer, die eine objektive elektrophoretische Analyse großer Zellzahlen ermöglichen (Smith et al., 1978). Diese Vorteile werden allerdings dadurch erkauft, daß während der Messung keine direkte optische Kontrolle der Zellsuspension und des gemessenen Partikels möglich ist. Folglich müssen an die Zellpräparation hohe Anforderungen gestellt werden, um eine Kontamination durch Staub oder korpuskuläre Elemente wie Thrombozyten und Erythrozyten zu vermeiden.

Dementsprechend mußten als Vorarbeit zu dieser Studie Präparationsmethoden erarbeitet werden,die die schnelle, routinemäßige Separierung von Leukozyten aus peripherem Blut in einer für die automatische Zellelektrophorese ausreichenden Reinheit ermöglicht. Nur die weitere Auftrennung der Leukozytensuspensionen in homogene Einzelfraktionen mit höchstens zwei, idealerweise nur einer Zellpopulation, die anhand von Vergleichsmethoden klassifiziert wird, gestattet initial eine sichere Zuordnung von EPM und Zelltyp.

UNIV. LIBRARY

Mit Hilfe dieser methodischen Voraussetzungen sollte zunächst untersucht werden inwieweit reife Lymphozyten hämatologisch gesunder Personen sich durch diskrete, reproduzierbare Mobilitäten charakterisieren lassen, Alters- und Geschlechtsunterschiede der Probanden die Mobilität beeinflussen und ob Änderungen des Funktionszustandes der Zellen, induziert durch Stimulation mit Mitogenen, mit Mobilitätsänderungen einhergehen.

Ferner sollten die elektrophoretischen Charakteristika verschiedener Vorläuferzellen der lymphatischen (Thymozyten) und myeloischen (Myelozyten, Promyelozyten, Blasten) Zellreihe mit denen der entsprechenden reifen Zellen (Lymphozyten, Granulozyten) verglichen werden.

Schließlich wurde anhand zweier hämatologischer Erkrankungen, der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) und der akuten myeloischen Leukämie (AML) die potentielle Bedeutung der analytischen Zellelektrophorese für die Klassifizierung und klinische Bewertung solcher Erkrankungen untersucht.
Im Falle der CLL, auf die sich diese Studie konzentriert, wurden die gemessenen Mobilitätsspektren korreliert mit den Resultaten einer Zelltypisierung unter Verwendung monoklonaler Antikörper und Rosettingverfahren, sowie mit den klinischen und Laborparametern, die üblicherweise zur Klassifizierung und klinischen Beurteilung dieser Leukämie herangezogen werden.

2. MESSMETHODE UND APPARATIVER AUFBAU

Elektrophoretische Messungen vitaler, in Suspension befindlicher Leukozyten wurden mit einem automatischen Zytopherometer (Lazypher) durchgeführt (Steiner, 1981a).Das Meßprinzip und der Aufbau des Zytopherometers sind in Abb. 1 schematisch dargestellt.
Meßprinzip: Das monochromatische Licht eines 4 mW HeNe Lasers wird durch eine Elektrophoresekammer geschickt und dort an den im elektrischen Feld sich bewegenden Partikeln (Zellen) gestreut. Das Streulicht ist aufgrund des optischen Doppler Effektes frequenzverschoben. Es wird unter einem Winkel θ ausgeblendet und zusammen mit Laserlicht der Ausgangsfrequenz einem Fotodetektor zugeführt. Dabei entsteht eine Intensitätsschwebung mit einer Schwebungsfrequenz (f_D), die der elektrophoretischen Geschwindigkeit (v) der Zellen proportional ist ($2\, f_D = K \cdot v$). Der Detektor wandelt das Lichtsignal in ein äquivalentes Streusignal um, dessen Frequenzinhalt mittels eines Spektrum-Analysators analysiert wird. Man erhält somit ein Frequenzdichtespektrum ("power spektrum"), bei dem die Frequenzen der auftretenden Maxima den Geschwindigkeiten der verschiedenen Zellpopulationen entsprechen. Da die elektrische Feldstärke während der elektrophoretischen Messung bekannt ist, kann das resultierende "power spektrum" direkt in elektrophoretische Mobilität (μ) umskaliert werden:

$$\mu = 2\, \pi\, f_D \,/\, K \cdot E \quad (\mu m cm \,/\, Vs)$$

wobei f_D die Dopplerfrequenz, E die elektrische Feldstärke entlang der Meßkapillare und K den vom Streuwinkel abhängigen Wellenvektor ($K = 4\, \pi\, n \sin \frac{\theta}{2} \,/\, \lambda$) bezeichnen.

Die Elektrophoresekammer besteht aus einer speziell beschichteten (Steiner, 1981b) rechteckigen Glaskapillare (22 mm lang, 0.1mm tief), das in ihr befindliche Probenvolumen von ca. 100 µl ist durch Dialysemembranen (Medicell Int.) von Pufferbehältern, welche die Elektroden beherbergen, getrennt.

Alle Versuche wurden bei einem Streuwinkel von $\theta = 15°$ und einer elektrischen Feldstärke von 45 Volt / cm durchgeführt. Die Stromstärke betrug bei dem verwendeten Puffer mit physiologischer Ionenstärke 0.9 mA. Die Kapillare war zur Kühlung von

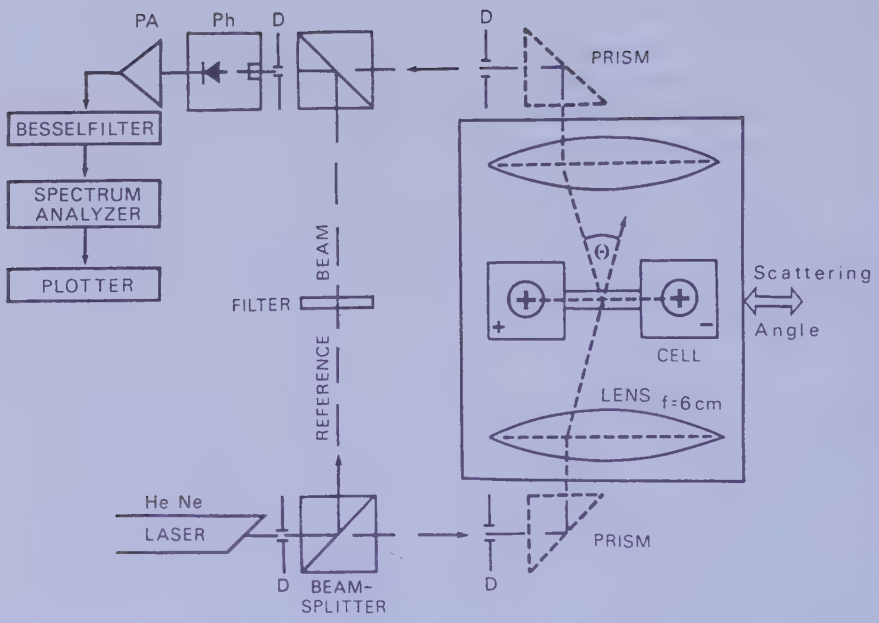

Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus und optischen Strahlengangs des Laser - Zytopherometers Lazypher^{R}. θ : Streuwinkel zwischen einfallendem und gestreutem Laserlicht; PA: Vorverstärker; Ph: Photodetektor; D: Diaphragma
Das Meßprinzip ist im Text beschrieben.

einem stationären Wasserbad umgeben, sodaß im Meßverlauf keine durch Joule'sche Wärme bedingten Störeffekte auftraten. Die Zahl der in das Meßergebnis eingehenden Zellen liegt üblicherweise zwischen 200 und 1000 Zellen. Die Genauigkeit der Messung beträgt ±1.2%. Ein Meßvorgang ist in ca. 5 - 10 Minuten abgeschlossen, da keine Auftrennung der Zellpopulationen erfolgt, sondern die Geschwindigkeit der Zellen unmittelbar gemessen wird, wenn sie sich im Laserstrahl, fokussiert auf 150 µm Ø, bewegen.

3. METHODIK DER ZELLPRÄPARATION

3.1 Zellsuspensionen

Als Medium für die Zellseparation und für alle elektrophoretischen Messungen diente, sofern nicht anders angegeben, das Zellkulturmedium RPMI 1640 mit 25 mM Hepes als Puffer bei einem pH-Wert von 7.35 und physiologischer Ionenstärke (I = 0.15). Die Isolierung der Lymphozyten erfolgte innerhalb von 24 Stunden nach der Blutentnahme. Die Zellkonzentration der Meßsuspension wurde auf 10^6 Zellen/ml eingestellt. Eine mikroskopische Beurteilung der Zellsuspensionen wurde anhand gefärbter Ausstriche nach Pappenheim vorgenommen sowie routinemäßig mittels Phasenkontrast unter Zuhilfenahme einer Zählkammer durchgeführt. Die Relation von mononuklearen Zellen (MNZ) zu Thrombozyten in der Meßsuspension lag in der Regel im Bereich 1:1 bis 2:1. Der Anteil vitaler Zellen, ermittelt durch Trypanblau-Ausschluß, überstieg ausnahmslos 95%. Zur Abschätzung der Monozytenkontamination diente die unspezifische Esterase Reaktion mit α-Naphtylacetat als Substrat (Yam et al., 1971).

3.2 Lymphozyten

Die Isolierung mononuklearer Zellen aus 5 - 10 ml heparinisierten Blutes (50 IU/ml) erfolgte durch Gradienten-Zentrifugation verdünnten Blutes über Ficoll-Hypaque (Bøyum, 1976): Die so gewonnene, MNZ und kontaminierende Thrombozyten enthaltende Suspension wurde nach einem Waschvorgang einem

diskontinuierlichen Gradienten von Percoll^{R} (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala) mit den Dichtestufen ρ = 1.04, 1,065 und 1.085 (g/cm³) überschichtet (Abb. 2). Die Schichthöhe der einzelnen Gradientenstufen in dem Kunsstoff-Zentrifugenröhrchen betrug, zunehmender Dichte nach aufgeführt, 5, 4 und 3 cm. Nach 12 minutiger Zentrifugation bei 90 g wurde das überschichtete Zellmedium und der überwiegende Teil (ca. 2/3) der Fraktion niedrigster Dichte mitsamt den darin enthaltenden Thrombozyten mit einer Pasteurpipette entfernt und die Zentrifugation für 20 Minuten bei 400 g fortgesetzt. Durch diese Kombination von"velocity sedimentation" bei niedriger g-Zahl und anschließender isopyknischer Zentrifugation erfolgt zunächst eine vorwiegend durch die Partikelgröße determinierte Separation, bei der die kleinen Thrombozyten langsamer sedimentieren als die MNZ (Miller und Phillips, 1969; Perper et al., 1968).
Nach Entfernen der thrombozytenreichen, aber bereits lymphozytenarmen leichteren Gradientenanteilen (Fraktion I in Abb. 2) und Fortsetzen der Zentrifugation bis zum Endpunkt bilden die Lymphozyten eine scharf demarkierte Bande an der 1.065/1.085 g/cm³ Phasengrenze, während Monozyten (Fraktion II, Abb. 2) kaum die 1.065 g/cm³ Schicht durchwandern (Ulmer und Flad, 1979; Pertoft et al., 1980).
Die Lymphozyten (Fraktion III, Abb. 2) wurden mit einer Pasteurpipette gesammelt, vor der Messung zweimal gewaschen und die Meßsuspension auf potentielle Restkontamination durch Blutplättchen untersucht.

3.3 Mitogen-Stimulation von Lymphozyten

Für die Herstellung von Makrokulturen (Bradley, 1980) werden MNZ unter sterilen Bedingungen über Ficoll-Hypaque isoliert (Bøyum, 1976), in Phosphat-gepuffertem RPMI 1640 (ohne Hepes), supplementiert mit 1% L-Glutamin, essentiellen Aminosäuren, 1% Streptomycin (Gibco) und 10% fetalem Kälberserum (FCS) (Flow Lab.) aufgenommen und bei einer Zell-

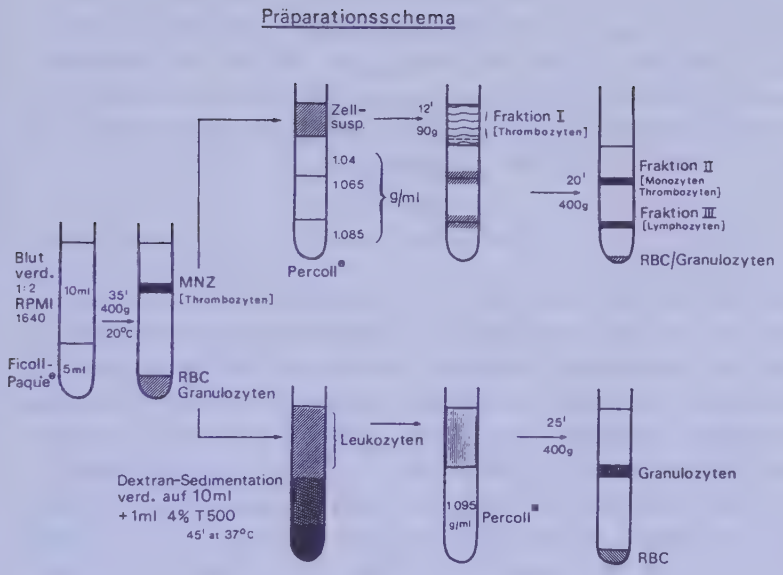

Abb. 2: Präparationsverfahren für die Isolierung von Lymphozyten und segmentkernigen Granulozyten aus peripherem Blut. Die Monozyten und Thrombozyten enthaltenden Fraktionen (I und II) wurden im allgemeinen verworfen.

konzentration von 2 x 10^6 /ml in 1ml Einheiten auf Zellkulturplatten (Costar Wells) verteilt. Phytohämagglutinin (PHA, Wellcome) wird hinzugegeben mit einer Endkonzentration von 10 µg/ml und die Platten bei 37 ° C, 5 % CO_2 und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 72 stündiger Kulturdauer werden die Zellen geerntet, tote Zellen über Ficoll-Hypaque abgetrennt (Mishell et al., 1980) und die transformierten Lymphozyten durch mehrfaches Waschen in RPMI 1640 mit Hepes als Puffer überführt.

3.4 Thymozyten

Um Thymozyten aus Thymusgewebe zu isolieren wird dieses so weit wie möglich von Fett und Blutgefäßen befreit, im Medium mit Schere und Pinzette zerkleinert und durch ein feines Stahlsieb gepreßt (Mishell et al., 1980). Verbleibende gröbere Gewebsstücke werden durch 5 - 10 minütige Sedimentation, Erythrozyten und tote Zellen durch anschließende Zentrifugation über Ficoll-Hypaque abgetrennt. Die Kontamination der Thymuszellsuspension mit MNZ des peripheren Blutes läßt sich durch Bestimmen des Verhältnisses von MNZ : Erythrozyten vor der Ficoll-Hypaque Zentrifugation abschätzen (Galili und Schlesinger, 1975) und war mit weniger als 1 % bei den Messungen zu vernachlässigen.

3.5 Myeloische Zellen

3.5.1 Granulozyten

Granulozyten lassen sich gewinnen (Abb. 2), indem der Bodensatz der Ficoll-Hypaque Zentrifugation peripheren Blutes mit RPMI 1640 auf 10 - 12 ml verdünnt und diese Suspension nach Zusatz von 1 ml Dextran T 500 (4% in 0.9% NaCl) bei 37°C für 45 Minuten inkubiert wird (Aguado et al., 1980). Die oberen leukozytenreichen Schichten werden abpipettiert, kontaminierende rote Blutkörperchen durch Zentrifugation über einen einstufigen Gradienten von Percoll mit der Dichte ρ = 1.095 g/cm³ abgetrennt (Segal et al., 1980) und die isolierten Granulozyten 2x in RPMI 1640 gewaschen.

3.5.2 Granulopoetische Vorstufen

Da Knochenmarkszellen gesunder Personen nicht zur Verfügung standen, wurden für elektrophoretische Messungen myeloische Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) isoliert. Leukämische Myeloblasten von zwei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) wurden ebenfalls isoliert und ihre elektrophoretische Mobilität (EPM) gemessen.
Die Methodik der Zellseparation umfaßte Gradienten-Zentrifugation über Ficoll-Hypaque wie bereits für Lymphozyten beschrieben, sowie Zentrifugation über einem diskontinuierlichen Gradienten von Percoll^{R} (Pharmacia) mit den Dichtestufen ρ = 1.067 g/mm³ und ρ = 1.082 g/mm³. Die Isolierung und Auftrennung von unreifen myeloischen Zellen mittels Dichtegradienten basiert auf der progredienten Zunahme des spezifischen Gewichts der Zellen, die in der myeloischen Reihe mit der Zellreifung einhergeht. Eine Analyse der Dichteverteilung menschlicher Knochenmarkszellen ergab folgende Mittelwerte (Olofsson et al., 1980): Myeloblasten 1.062 g/mm³, Promyelozyten 1.073 g/mm³, Myelozyten 1.078 g/mm³, Metamyelozyten 1.08 g/mm³, Granulozyten 1.086 g/mm³. Promyelozyten hatten eine bimodale Dichteverteilung mit einem zusätzlichen kleinen Zellanteil der Dichtestufe 1.067 g/mm³. Wegen der starken Überlappung der Dichtewerte konnte keine reine Suspension eines individuellen Zelltyps isoliert werden, die maximale Anreicherung von Zellen wurde für Myelozyten erzielt und lag bei 40% der Zellen. Diese Grundlagen lassen sich auf myeloische Vorstufen bei CML übertragen, die durch die Präparation erzielte Anreicherung bestimmter Zelltypen war abhängig von deren relativen Anteilen im peripheren Blut der Patienten.

Durch Ficoll-Hypaque Gradienten-Zentrifugation wurden stabkernige und segmentkernige Granulozyten und ein Teil der Metamyelozyten eliminiert, die resultierenden Zellsuspensionen enthielten:
- Myeloblasten in mehr als 90%iger Reinheit bei zwei Patienten

mit AML, deren Differentialblutbilder vor der Separation 84% bzw. 70% Blasten zeigten.
- Myelozyten als größte Einzelfraktion mit ca. 60% der Zellen bei einem Patienten mit CML während der chronischen Phase; die restlichen Zellen umfaßten die übrigen myeloischen Vorstufen und Lymphozyten.
- Ein Zellgemisch aus allen myeloischen Vorstufen mit Überwiegen der Blasten bei zwei Patienten mit CML während des Blastenschubs.

Die letztgenannte heterogene Suspension wurde durch Zentrifugation (400g, 12') über den zweistufigen Percoll-Gradienten in zwei Fraktionen aufgeteilt; die Fraktion niedriger Dichte ($\rho \leq 1.067$ g/mm³) war eine recht homogene Blastensuspension mit geringer Kontamination durch Promyelozyten und Myelozyten, die Fraktion höherer Dichte ($\rho > 1.067$ g/mm³) enthielt nach wie vor alle Vorstufen vom Blasten bis zum Metamyelozyten, doch war der Blastenanteil gegenüber der Ausgangssuspension deutlich kleiner.

3.6 Immunologische Zelltypisierung

Die Immunfluoreszenzuntersuchung zur immunologischen Typisierung der CLL-Lymphozyten wurde mit geringen Modifikationen nach der Methode von Doxiades et al., (1984) unter Verwendung monoklonaler Antikörper im Labor von Prof. Dr. Grosse-Wilde, Essen, durchgeführt.
Die Analyse der CLL-Lymphozyten in Bezug auf ihre Fähigkeit mit verschiedenen roten Blutzellen Rosetten zu bilden, wurden im Labor von Prof. Dr. Thierfelder, München, vorgenommen.

Lymphozyten werden allgemein unterteilt in T-Zellen, deren Prägung und Differenzierung im Thymus erfolgt und in B-Zellen, deren Entwicklung thymusunabhängig ist. Sowohl in ihrer Funktion als auch in der Expression bestimmter Oberflächenmerkmale unterscheiden sich Zellen dieser beiden Gruppen. Diese unterschiedlichen Eigenschaften bilden die Basis für die Zuordnung lymphatischer Neoplasien zu einer der beiden Populationen (Aisenberg, 1981).

Die Zugehörigkeit zur B-Zellreihe wird bewiesen durch den Nachweis von Oberflächenimmunglobulin (bei dieser Typisierung erkennbar am Prozentsatz von Zellen, die mit SmIg-FITC reagierten), die Flächendichte der Immunglobuline ist gegenüber normalen B-Zellen vermindert (Rabellino et al.,1971; Slease et al.,1979). Ia-artige oder HLA-DR Antigene galten zunächst als B-Zell spezifisch, befinden sich aber auch auf aktivierten T-Lymphozyten, Monozyten und myeloischen Vorläuferzellen. Monoklonale Antikörper gegen diese Antigene sind z.B. OK Ia1 und NEI 011, eine hohe Reaktivität stützt die Diagnose einer B-CLL (Bowman und Mauer, 1981; Thiel, 1983).
Rosettenbildung mit Mäuseerythrozyten ist ein Merkmal einer sehr kleinen Population normaler B-Zellen und findet sich in einem höheren Prozentsatz bei B-CLL (Stathopoulos und Elliott, 1974; Kuhlein et al., 1982).
Rezeptoren für die 3. Komponente des Komplementsystems (C'3, in dieser Studie nicht getestet) und für das F_c-Fragment von Immunglobulinen, ermittelt durch Rosettenbildung mit Antikörperbeschichteten Rindererythrozyten (E_{ox}A-Rosetten, für B-CLL Zellen nicht spezifisch), sind auf Lymphozyten bei B-CLL meist nachweisbar (Foon et al., 1982).
Das Fehlen bestimmter T-Zell Marker, z.B. des Membranrezeptors für Schafserythrozyten oder der Oberflächenantigene, die durch die monoklonalen Antikörper OKT 3,4,8, Leu 2a,2b und 3a (in dieser Studie zur Typisierung verwendet) erfaßt werden, spricht für eine B-CLL. Allerdings weisen Lymphozyten bei B-CLL häufig eine Kreuzreaktivität mit Antikörpern auf, die gegen bestimmte T-Zell und Thymozyten Antigene gerichtet sind, dazu gehören z.B. Lyt 2 und Leu 1 (Munker et al., 1983).
Kriterien für die Klassifizierung einer CLL als der T-Zell Reihe zugehörend sind die Bildung von Rosetten mit Schafserythrozyten (E-Rosetten), sowie die Reaktivität mit nicht kreuzreagierenden Antikörpern gegen T-Zellen (OKT 3, TÜ 33) und T-Zell Subpopulationen, z.B. OKT 4, Leu 3a (Helfer/Inducer) und OKT 8, Leu 2a, Leu 2b (Suppressor/zytotoxisch) (Schroff et al., 1983).

4. PATIENTEN UND PROBANDEN

Elektrophoretische Mobilitäten von Lymphozyten folgender Personengruppen wurden gemessen:
- 34 weiblichen und 21 männlichen gesunden Erwachsenen im Alter von 17 bis 57 Jahren (Alter in 11 Fällen nicht genau bekannt).
- 5 weiblichen und 6 männlichen Kindern im Alter zwischen 1 und 14 Jahren mit Asthma bronchiale und/oder Pollinosis (n = 9), endogenem Ekzem (n = 1) und angeborenem Herzfehler (n = 1).
- 3 Myasthenia gravis Patienten und zwei gesunden Probanden, vor und nach Mitogenstimulation und 3- bzw. 7-tägiger Inkubation der Lymphozyten.

Elektrophoretische Mobilitäten von Thymozyten wurden gemessen bei 4 Kindern mit angeborenen Herzfehlern und bei einem erwachsenen Patienten mit Klappenvitium. Die Zellen wurden gewonnen aus einer im Rahmen einer Thorakotomie durchgeführten Thymusbiopsie. Keiner dieser Patienten erhielt zur Zeit der Gewebsentnahme eine immunsuppressive Therapie, es bestand kein Hinweis auf eine immunologische Erkrankung.

Elektrophoretische Mobilitäten von segmentkernigen Granulozyten wurden bei 6 gesunden Probanden im Alter zwischen 24 und 33 Jahren bestimmt.

Die Gruppe der Leukämiepatienten umfaßte:
- 16 Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) (13 männlich, 3 weiblich) im Alter von 36 bis 88 Jahren.

Neun der 16 Patienten befanden sich im Stadium III oder IV nach der Rai-Klassifikation, 5 im Stadium II, je einer in den Stadien 0 und I. Zum Zeitpunkt der Messung erhielten 9 Patienten eine zytostatische Therapie, bei 5 Patienten in Form von Leukeran, bei zweien als Kombination von Leukeran und Kortikosteroiden, in einem Fall allein mit Kortikosteroiden. Ein Patient wurde wegen mediastinaler Lymphome zusätzlich zur

medikamentösen Therapie bestrahlt; klinisch bestand wegen der massiven Hepatosplenomegalie bei gering ausgeprägten peripheren Lymphomen sowie dem zytochemischen Nachweis der sauren Phosphatase in 80 % der Lymphozyten der Verdacht auf eine T-CLL (nicht typisiert). Bei zwei weiteren Patienten war der Nachweis der sauren Phosphatase in 10 % bzw. 90 % der peripheren Lymphozyten positiv (beide typisiert). Zwei Patienten hatten ein ungewöhnlich niedriges Alter (36 bzw. 41 Jahre), einer davon (36 J., männlich) hatte eine rasch progrediente Erkrankung die nach einjähriger Dauer letal endete. Bei keinem der 16 Patienten bestand zur Zeit der Messung eine monoklonale Gammopathie.

- Je zwei Patienten mit chronisch myeloischer bzw. akuter myeloischer Leukämie. Es handelte sich im Einzelnen um

.. einen 47-jährigen männlichen Patienten mit Philadelphia Chromosom positiver chronisch myeloischer Leukämie (CML); Zum Zeitpunkt der ersten Messung in der chronischen Phase mit den klinisch typischen Befunden einer massiven Hepatosplenomegalie und einer Leukozytose von 103000 Zellen/mm^3 mit myeloischen Vorstufen unterschiedlichen Reifegrades im peripheren Blut (Myelozyten stellten mit ca. 30% die größte Einzelfraktion) und zum Zeitpunkt der zweiten Messung im Blastenschub mit 36% Blasten, 13% Promyelozyten und 21% Myelozyten im peripheren Blut. Die zytochemische Untersuchung war positiv für Myeloperoxidase und negativ für PAS.

.. eine 68-jährige Patientin im Blastenschub einer klinisch typischen CML bei der kein Philadelphia Chromosom nachgewiesen wurde. PAS-negative, Myeloperoxidase-positive Blasten machten 59% der peripheren Leukozyten aus, mit 2% Promyelozyten, 5% Myelozyten, 11% Metamyelozyten. Die Leukozytenzahl betrug 51000 / mm^3.

.. einen 67-jährigen Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML) vom Typ M 2 nach der FAB - Klassifikation.

Die Myeloblasten hatten einen Anteil von 70% der peripheren Leukozyten (65000 / mm³), waren Peroxidase-positiv und enthielten z.T. promyelozytäre Granulationen und vereinzelt Auerstäbchen.

.. einen 8-jährigen Jungen mit einer AML vom Typ FAB M 1. Der zytochemische Nachweis der Myeloperoxidase erfolgte in mehr als 90% der Blasten bei vereinzelt positiver, schwach diffuser PAS Reaktion. Weder Auerstäbchen noch Granulationen waren erkennbar. Bei einer Leukozytenzahl von 27000 / mm³ ergab das Differentialblutbild 84% Blasten, 16% Lymphozyten.

5. ERGEBNISSE

5.1 Periphere Lymphozyten hämatologisch gesunder Personen

Die elektrophoretischen Spektren der peripheren Lymphozyten von Erwachsenen und Kindern zeigen typischerweise zwei Mobilitätsbereiche (Abb. 3 und 4).

Die dominierende Zellpopulation hoher Mobilität, die T-Lymphozyten (siehe Diskussion), besitzt bei der Erwachsenengruppe die mittlere Mobilität $\bar{\mu} = 1.23 \pm 0.03$ µmcm/Vs und eine mittlere Halbwertsbreite (HWB) von 0.14 ± 0.03 µmcm/Vs, bei den Kindern die mittlere Mobilität $\bar{\mu} = 1.18 \pm 0.01$ µmcm/Vs und eine gleichgroße HWB. Die Mobilitätswerte für die Einzelpersonen sind in den Tabellen 1 und 2 aufgeführt. Der Mobilitätsunterschied zwischen den schnellen Lymphozytenpopulationen des Erwachsenen- und Kinderkollektivs ist bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $p = 0.001$ (t-Test, kontrolliert durch den Wilcoxon Test) statistisch signifikant.
Eine Abhängigkeit der EPM vom Geschlecht besteht nach unseren Messungen nicht.

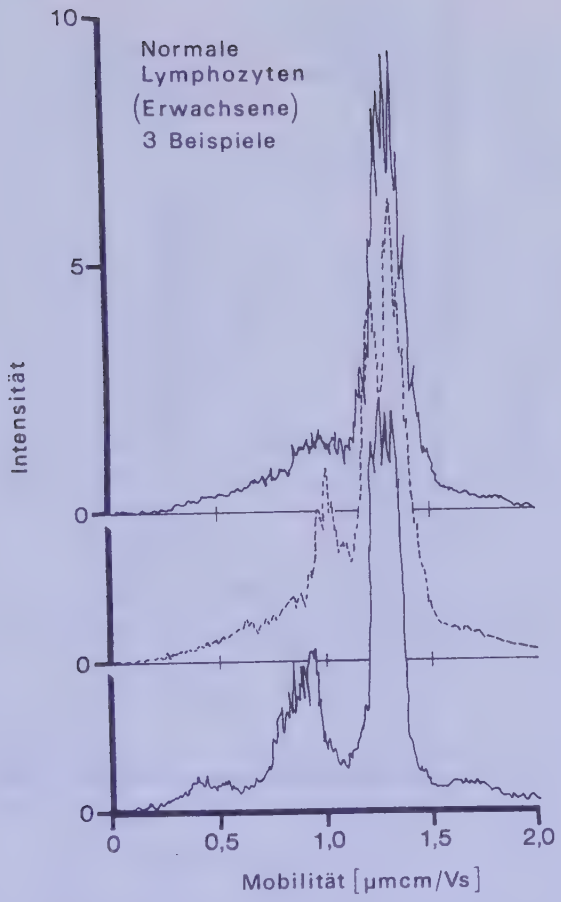

Abb. 3: Drei repräsentative Beispiele für elektrophoretische Mobilitätsspektren von peripheren Lymphozyten gesunder Erwachsener. Es lassen sich Zellen höherer EPM (μ = 1.23 $\pm$ 0.03 µmcm/Vs) und niedriger EPM (μ = 0.92 $\pm$ 0.04 µmcm/Vs) unterscheiden. Deutlich zu erkennen ist die starke Variabilität der Signalintensität der langsam wandernden Zellpopulation.

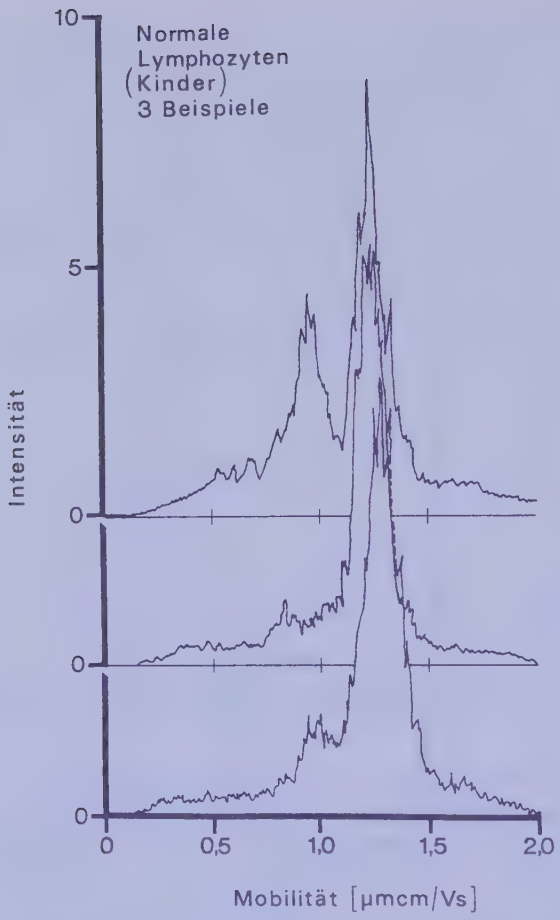

Abb. 4: Drei typische elektrophoretische Mobilitätsspektren der peripheren Lymphozyten von Kindern zeigen eine gute Übereinstimmung mit denen von Erwachsenen. Die EPM der schnell wandernden Lymphozytenpopulation ist mit $\mu = 1.18 \pm 0.01$ µmcm/Vs geringfügig aber statistisch signifikant niedriger als bei Erwachsenen ($\mu = 1.23 \pm 0.03$ µmcm/Vs). Auch hier schwankt die Signalintensität der langsam wandernden Zellpopulation von Fall zu Fall erheblich.

Patient	Alter (Jahre) Geschlecht		E P M (µmcm/Vs) Lymphozyten Langsamer Anteil	Schneller Anteil
1. n.b.	n.b.	w	1.02	1.31
2. n.b.	n.b.	w	0.93	1.24
3. n.b.	n.b.	w	0.85	1.22
4. n.b.	n.b.	w	0.92	1.21
5. n.b.	n.b.	w	0.95	1.23
6. n.b.	n.b.	w	0.96	1.26
7. n.b.	n.b.	m	0.97	1.24
8. n.b.	n.b.	w	-	1.19
9. n.b.	n.b.	w	0.92	1.26
10. n.b.	n.b.	w	0.87	1.22
11. R.S.	35	w	0.96	1.27
12. W.M.	41	w	0.92	1.21
13. E.B.	29	w	-	1.22
14. A.B.	29	w	0.90	1.24
15. O.O.	23	m	0.91	1.21
16. S.H.	27	w	0.96	1.24
17. M.H.	44	w	0.89	1.25
18. B.S.	26	w	0.90	1.25
19. R.W.	33	w	-	1.22
20. U.S.	21	w	0.92	1.23
21. U.B.	22	w	-	1.19
22. J.F.	24	m	0.90	1.17
23. A.K.	21	w	-	1.22
24. B.W.	20	w	-	1.25
25. G.S.	24	w	-	1.22
26. M.M.	37	w	0.88	1.24
27. S.S.	17	w	0.88	1.28
28. A.G.	19	w	0.92	1.21
29. L.W.	19	w	-	1.24
30. E.M.	17	w	-	1.21

Tabelle 1: Elektrophoretische Mobilitätswerte der peripheren Lymphozyten von 55 gesunden Erwachsenen.

Patient	Alter (Jahre) Geschlecht		EPM (µmcm/Vs) Lymphozyten Langsamer Anteil	Schneller Anteil
31. H.K.	17	w	0.89	1.25
32. G.S.	27	m	0.97	1.28
33. R.M.	35	m	0.93	1.20
34. P.L.	22	m	0.94	1.20
35. R.W.	36	m	0.97	1.22
36. J.N.	49	m	0.92	1.26
37. K.P.	19	m	0.92	1.22
38. R.O.	57	m	0.95	1.29
39. W.Z.	29	m	0.87	1.19
40. W.A.	19	m	0.95	1.23
41. H.T.	26	m	0.92	1.23
42. I.J.	31	w	0.96	1.22
43. E.S.	19	m	0.92	1.25
44. K.K.	28	m	-	1.20
45. W.S.	31	m	-	1.21
46. H.K.	27	m	0.95	1.20
47. S.B.	18	w	0.87	1.23
48. M.S.	25	m	0.92	1.26
49. J.T.	33	m	0.91	1.29
50. A.B.	19	w	0.82	1.19
51. H.M.	23	w	-	1.24
52. G.H.	23	w	-	1.23
53. L.N.	50	w	-	1.21
54. R.H.	35	m	0.95	1.21
55. R.S.	39	m	0.91	1.22

Tabelle 1 (Forts.): Elektrophoretische Mobilitätswerte der peripheren Lymphozyten von 55 gesunden Erwachsenen.

Patient	Alter (Jahre) Geschlecht		E P M (µmcm/Vs) Lymphozyten Langsamer Anteil	Schneller Anteil	
1. M.P.	1	m	1.01	1.21	Asthma bronchiale
2. A.H.	2	w	-	1.17	Endogenes Ekzem
3. A.J.	5	w	0.93	1.19	Pollinosis
4. D.M.	7	m	0.92	1.18	Asthma bronchiale
5. K.L.	7	m	-	1.18	Herzvitium
6. J.M.	10	m	0.93	1.19	Asthma bronchiale
7. E.B.	11	m	0.91	1.16	Asthma bronchiale
8. C.L.	11	w	0.92	1.18	Pollinosis, Asthma bronchiale
9. P.G.	14	w	0.88	1.18	Pollinosis, Asthma bronchiale
10. O.T.	14	m	-	1.20	Bronchiale Hyperreagibilität
11. M.K.	14	w	0.93	1.19	Asthma bronchiale (Infektbedingt)

Tabelle 2: Elektrophoretische Mobilitätswerte der peripheren Lymphozyten von 11 Kindern

Die anteilsmäßig kleinere Lymphozytenpopulation mit niedriger Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld - die B-Lymphozyten (siehe Diskussion) - hat eine mittlere Mobilität von $\bar{\mu}$ = 0.92 ± 0.04 µmcm/Vs für Erwachsene und von $\bar{\mu}$ = 0.93 ± 0.03 µmcm/Vs für Kinder. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant. Die individuellen Mobilitätswerte sind in den Tabellen 1 und 2 aufgeführt. Bei den zahlreichen Messungen fällt die große Streubreite der einzelnen Mobilitätswerte sowie die erheblichen Unterschiede in der Signalintensität (Abb. 3 und 4) auf. In Einzelfällen fehlte die Fraktion langsamer Zellen völlig.

5.2 Periphere Lymphozyten bei 16 Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL)

5.2.1 Mobilitätsmessungen

Die Mobilitäten aller untersuchten Lymphozytenproben liegen kontinuierlich verteilt zwischen µ = 0.98 und 1.24 (µmcm/Vs). Sie sind in Abb. 5 den elektrophoretischen Mobilitäten normaler T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Thymozyten gegenübergestellt. Die HWB des Mobilitätsprofils der CLL Lymphozyten entspricht mit 0.13 ± 0.03 µmcm/Vs etwa dem bei normalen T-Lymphozyten gemessenen Wert von 0.14 ± 0.03 µmcm/Vs. Die einzelnen Mobilitätswerte für die 16 Patienten sind zusammen mit klinischen- und Labordaten in Tabelle 3 wiedergegeben.

Bei 12 der 16 Patienten zeigten die Mobilitätsspektren der Lymphozyten eine unimodale und symmetrische Mobilitätsverteilung. In zwei Fällen (Nr. 11 und 12, Tab. 3) war die Basis geringfügig asymmetrisch verbreitert in Richtung höherer Mobilitäten, in einem Fall (Nr. 2) wurde zusätzlich ein kleines diskretes Signal im normalen T-Zell Bereich (µ = 1.24 µmcm/Vs) registriert, bei einem Patienten (Nr. 5) war ein minimales zusätzliches Signal mit µ = 0.76 µmcm/Vs abzugrenzen.

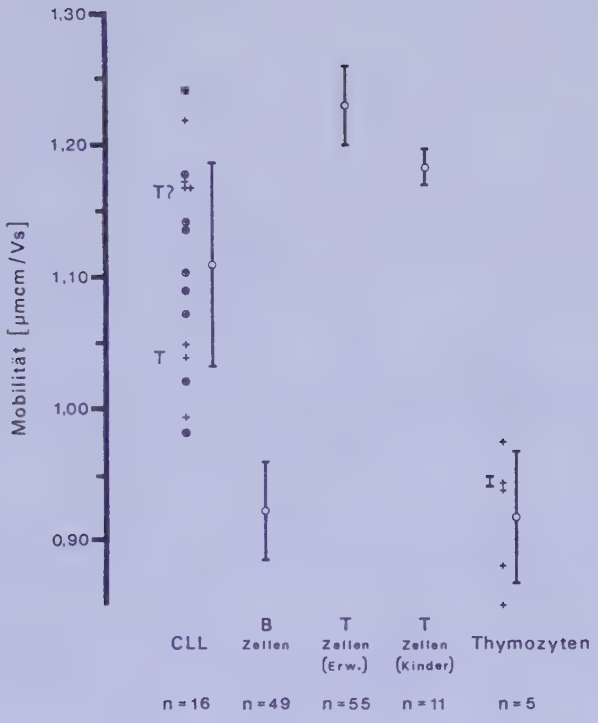

Abb. 5: Die Mobilitätsverteilung der Lymphozyten von 16 Patienten mit CLL ist den mittleren Mobilitäten von T- und B-Lymphozyten sowie von Thymozyten hämatologisch gesunder Probanden gegenübergestellt. Die vertikalen Balken geben die Standardabweichung an.

⊕ = Meßwerte bei immunologisch gesicherter B-CLL

T + = Meßwert in einem Fall von T-CLL

T? + = Verdacht auf T-CLL aufgrund klinischer und histochemischer Befunde; keine Typisierung durchgeführt.

\+ = Keine Typisierungsergebnisse vorhanden

I + = Thymozyten aus altersinvolutiertem Thymus

Patient	Geschlecht	Alter(Jahre)	E P M (µmcm/Vs)	Rai-Stadium	Lymphozyten (%)	Lymphozyten abs./mm³	Serum Gamma-Globuline (g/dl)	Erkr.-dauer (Jahre)	Therapie
1. P.D.	60	m	1.14	II	82	17500	1.062	10	ø
2. E.S.	80	w	0.98	III	81	29200	0.143	11	ø
3. H.S.	70	m	1.14	IV	94	12800	0.796	6	Leukeran, Urbason
4. E.W.	88	m	1.24	0	89	21200	0.878	2.5	ø
5. F.L.	78	m	1.10	III	90	15300	0.233	3.5	Leukeran
6. F.R.	52	m	1.07	III	92	34300	1.00	7.5	Leukeran
7. P.W.	36	m	1.02	III	61	11500	0.40	1	Leukeran, Ultralan
8. H.B.	60	m	1.18	II	54	9800	0.96	2.5	Leukeran
9. B.N.	41	w	1.09	III	89	56700	0.518	2.5	Prednison
10. S.J.	68	w	1.04	II	82	9900	0.238	6.5	Leukeran
11. J.F.	69	m	1.17	II	84	23300	0.877	1.5	ø
12. A.E.	73	m	0.99	II	84	16600	0.12	0.5	ø
13. H.G.	65	m	1.05	IV	94	84100	0.24	5.5	ø
14. J.S.	70	m	1.17	IV	98	353000	1.05	3.5	Leukeran, Radiatio
15. E.H.	83	m	1.22	IV	99	422000	1.28	1.5	Leukeran
16. A.R.	75	m	1.17	I	70	7700	1.033	1	ø

Tabelle 3: Klinische und Labordaten von 16 Patienten mit CLL

Die durchschnittliche EPM der Lymphozyten zytostatisch behandelter Patienten (n = 9) unterschied sich mit $\bar{\mu}$ = 1.12 ± 0.06 µmcm/Vs kaum von der elektrophoretischen Mobilität nicht antineoplastisch therapierter Patienten (n = 7) mit $\bar{\mu}$ = 1.11 ± 0.09 µmcm/Vs.
Lymphozyten von Patienten im Rai-Stadium II (n = 5) hatten im Mittel eine EPM von µ = 1.10 ± 0.07 µmcm/Vs, im Stadium III (n = 5) von µ = 1.05 ± 0.05 µmcm/Vs, im Stadium IV (n = 4) von µ = 1.15 ± 0.06 µmcm/Vs, je ein Patient befand sich im Stadium 0 (µ = 1.24 µmcm/Vs) und I (µ = 1.17 µmcm/Vs)(Abb. 6).

Ein Zusammenhang zwischen der EPM der Lymphozyten und dem Erkrankungsstadium (Abb. 6), der Erkrankungsdauer seit Diagnosestellung (Abb. 7), der Geschwindigkeit der Krankheitsprogression oder der Höhe der Lymphozytose zur Zeit der Messung war nicht nachweisbar.

Die Lymphozyten von 7 Patienten mit deutlicher Hypogammaglobulinämie (0.12 - 0.52 g/dl) hatten Mobilitätswerte zwischen µ = 0.98 und µ = 1.10 (µmcm/Vs), im Mittel $\bar{\mu}$ = 1.04 ± 0.04 µmcm/Vs, 9 Patienten mit normalem (n = 6) oder leicht vermindertem (n = 3) Gammaglobulingehalt hatten elektrophoretische Mobilitäten zwischen µ = 1.0 und 1.24 (µmcm/Vs), im Mittel $\bar{\mu}$ = 1.17 ± 0.05 µmcm/Vs. Hier besteht eine gute Korrelation zwischen der EPM der CLL-Lymphozyten und dem Gammaglobulingehalt des Patientenserums mit einem Korrelationskoeffizienten von r = + 0.83 (Abb. 8).

5.2.2 Immunologische Typisierung

Lymphozyten von 10 der 16 Patienten wurden immunologisch typisiert, die Ergebnisse der Immunfluoreszenzuntersuchung und der Rosettenversuche sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

9 dieser Patienten hatten eine B-CLL, charakterisiert durch eine geringe oder fehlende Reaktivität mit Anti-T-Zell Seren (n = 7), eine nur kleine Zahl E - Rosetten bildender Lymphozyten (n = 4), eine ausgeprägte Reaktivität mit SmIg, cHLA-DR

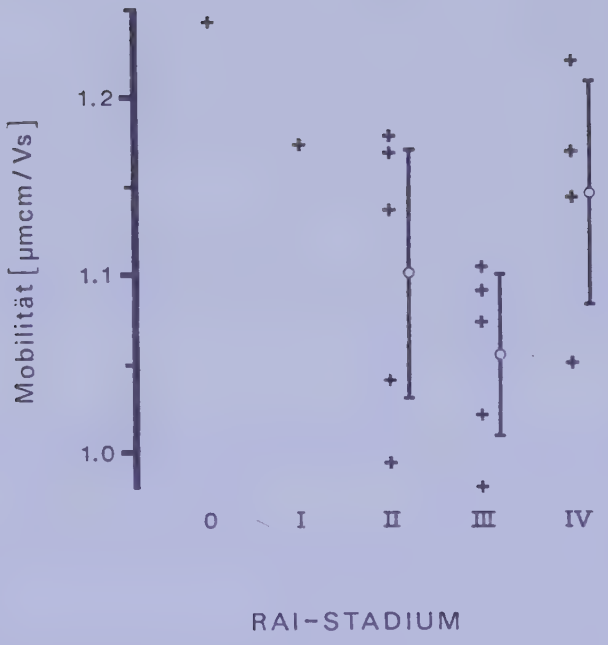

Abb. 6: Mobilitätsverteilung der Lymphozyten von 16 CLL Patienten in Abhängigkeit vom klinischen Stadium (der Rai-Klassifikation) zur Zeit der elektrophoretischen Messung.

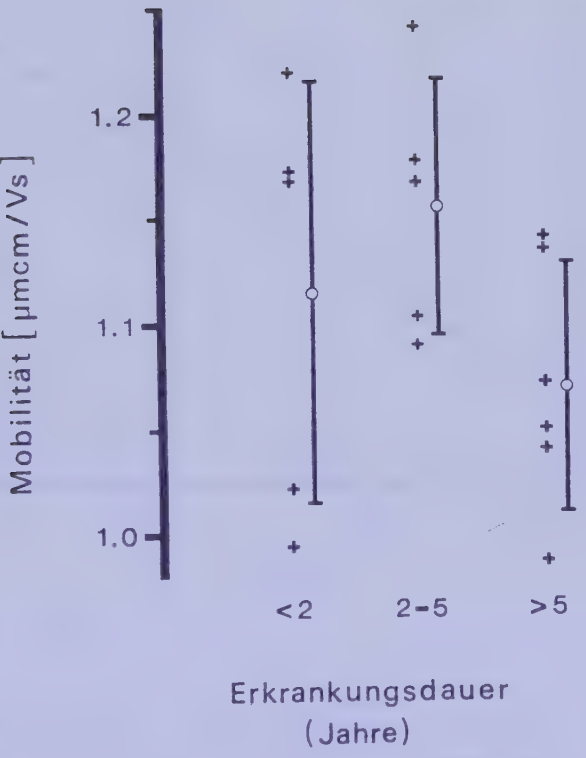

Abb. 7: Verteilung der elektrophoretischen Mobilitätswerte nach einer unterschiedlich langen Erkrankungsdauer, errechnet nach dem Zeitpunkt der Erstdiagnose.

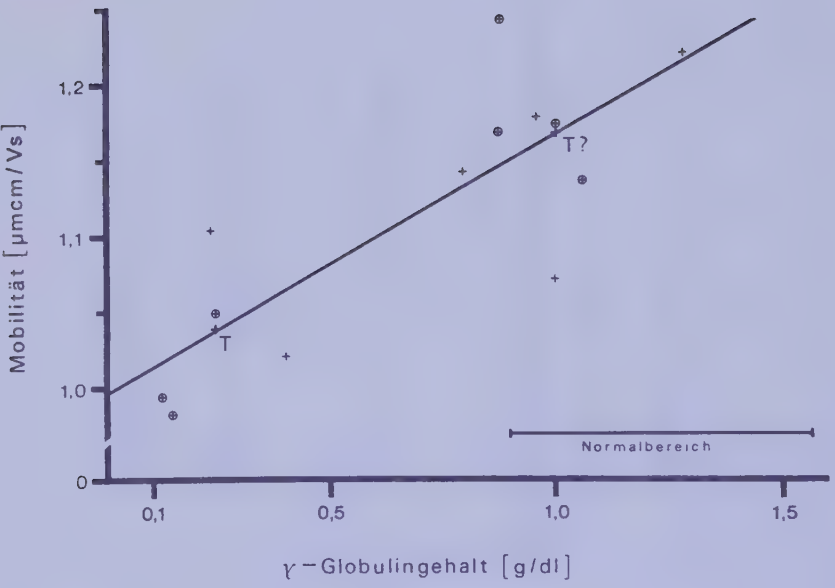

Abb. 8: Korrelation zwischen EPM der CLL-Lymphozyten und dem Gammaglobulingehalt des Patientenserums. Der Korrelationskoeffizient beträgt r = + 0.83. Sowohl bei zytostatisch therapierten Patienten (+) als auch bei Patienten ohne Chemotherapie (⊕) sind Lymphozyten hoher wie auch niedriger Mobilität zu beobachten.
T = Meßwert in einem Fall von T-CLL
T? = Verdacht auf T-CLL aufgrund klinischer und histochemischer Befunde; keine Typisierung durchgeführt.

	1 P.D. (%)	2 E.S. (%)	3 H.S. (%)	4 E.W. (%)	5 F.L. (%)	6 F.R. (%)	7 P.W. (%)	8 H.B. (%)	9 ** B.N. (%)	10 ** S.J. (%)
OKT 3 (Pan - T)	0	46	0	0	0	1	-	-	-	-
E - Ros.- Rez.	0	32	0	0	0	-	-	-	-	-
TÜ 33 (Pan - T)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100
Leu 1 (Pan - T)	-	-	-	-	-	70	-	-	-	-
OKT 4 (T Helfer/Inducer)	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
Leu 3a (T Helfer/Inducer)	0	19	0	0	0	-	-	-	-	-
OKT 8 (T Suppressor/zytotoxisch)	0	16	0	0	0	0	-	-	-	-
Leu 2a (T Suppressor/zytotoxisch)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	80
Leu 2b (T Suppressor/zytotoxisch)	3	14	0	0	0	-	-	-	-	-
NEI 011(cHLA-DR)	71	94	28	52	57	-	-	-	-	-
sIg - FITC	62	86	12	47	76	88	29	-	-	-
OKM 1 (Monozyten, Granulozyten)	1	21	0	1	0	5	-	-	-	-
OKT 10 (Thymisches Antigen)	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-
OK Ia1 (HLA-DR, monomorph)	-	-	-	-	-	80	-	-	-	-
Lyt 2 (Pan - T und B CLL)	-	-	-	-	-	71	-	34	-	-
E - Rosetten (T Zellen)	-	-	-	-	-	0	9	12	2	-
$E_{ox}A$ - Rosetten (F_c Rezeptor)	-	-	-	-	-	10	34	22	2	-
E_{mouse}- Rosetten(B CLL)	-	-	-	-	-	1	-	34	4	-

Tabelle 4: Ergebnis der immunologischen Oberflächenmarkeranalyse bei 10 CLL Patienten

** Die Typisierung erfolgte mit zahlreichen, bisher nicht beschriebenen Antikörpern (Dr. Doxiades, Privatkommunikation). Sie ergab bei Pat. Nr. 9 60-100% Reaktivität mit Anti-B-Zell Seren.

(n = 5) und OK Ia1 (n = 1), sowie dem Nachweis von Rezeptoren für Mäuseerythrozyten und das F_C-Fragment von Immunglobulinen (n = 2). Bei einer Patientin (Nr. 9 in Tab. 4) wurde die Austestung mit zahlreichen Antikörpern durchgeführt. 60 - 100 % der Zellen reagierten mit Anti-B-Zell Seren bei nur sehr geringer Reaktivität mit Anti-T-Zell Antikörpern *.
In einer Patientenprobe mit einer dominierenden B-CLL Zellpopulation (86% $SmIg^+$, 94% $HLA\text{-}DR^+$) reagierten zahlreiche Zellen auch mit den Anti-T-Zell Antikörpern OKT 3 (pan T, 46%), E-Ros.-Rez. (32%), Leu 3a (Helfer/Inducer, 19%), OKT 8 und Leu 2b (Suppressor/zytotoxisch, 16% bzw. 14%). Es scheint demzufolge eine relativ große Population reifer T-Zellen in der Lymphozytenprobe enthalten zu sein.

Die Lymphozyten eines Patienten reagierten fast ausschließlich mit Anti-T-Zell Seren, z.B. TÜ 33 (pan T) in 100 % und Leu 2a (Suppressor/zytotoxisch) in 80 %, nur schwach mit monoklonalen Antikörpern die gegen B-Zell Antigene gerichtet waren. Diese CLL wurde als Suppressor-T-CLL klassifiziert *.

5.2.3 Typisierungsergebnisse und elektrophoretische Mobilität

Kein Zusammenhang ist zwischen den Ergebnissen der immunologischen Typisierung und der EPM zu erkennen, wie aus den nachfolgenden Einzelheiten hervorgeht.
Die EPM der CLL-Lymphozyten liegt bei zwei Patienten mit μ = 1.24 und 1.22 (µmcm/Vs) in dem für normale T-Zellen von Erwachsenen ermittelten Mobilitätsbereich ($\bar{\mu}$ = 1.23 $\pm$ 0.03 µmcm/Vs). Bei einem dieser Patienten war die CLL nachgewiesenermaßen vom B-Typ, die Lymphozyten zeigten keine Reaktivität mit Anti-T-Zell Seren. Bei dem zweiten Patienten liegen keine Typisierungsergebnisse vor.

---

* Die Ergebnisse der Typisierung wurden von Dr. Doxiades, Essen, mitgeteilt (Privatkommunikation), die verwendeten monoklonalen Antikörper sind überwiegend noch nicht beschrieben.

In vier weiteren Fällen liegt die EPM mit μ = 1.18, 1.173 und 1.168 (2x) (μmcm/Vs) innerhalb der doppelten Standardabweichung der T-Zell Mobilitäten, eine immunologische Markeranalyse wurde in einem Fall (Nr. 8, Tab. 4) durchgeführt und ergab eine B-CLL, bei einem Patienten (Nr. 14, Tab. 3) bestand aufgrund klinischer Befunde und des zytochemischen Nachweises der sauren Phosphatase in 80 % der Lymphozyten der Verdacht auf eine T-CLL.
Die Lymphozyten des Patienten mit immunologisch bestätigter T-CLL vom Suppressor Typ hatten eine EPM von μ = 1.04 μmcm/Vs, schneller als normale B-Lymphozyten ($\bar{\mu}$ = 0.92 $\pm$ 0.04 μmcm/Vs) oder Thymozyten ($\bar{\mu}$ = 0.92 $\pm$ 0.05 μmcm/Vs), aber bedeutend langsamer als normale T-Lymphozyten ($\bar{\mu}$ = 1.23 $\pm$ 0.04 μmcm/Vs) (Abb. 5).
In 7 weiteren Fällen von immunologisch typisierter B-CLL ist die EPM der Zellen z.T. niedriger (Nr.2, μ = 0.98 μmcm/Vs; Nr.13, μ = 1.02 μmcm/Vs), z.T. höher (Nr.1,6,8,9,16, μ = 1.07 - 1.14 μmcm/Vs) als die EPM der T-CLL Lymphozyten.

5.3 Thymozyten

Die mittlere EPM der Thymozyten von 5 immunologisch gesund erscheinenden Personen lag mit $\bar{\mu}$ = 0.92 $\pm$ 0.05 μmcm/Vs um 22 - 25 % niedriger als die der peripheren T-Lymphozyten (Abb. 5), die HWB der Hauptpeaks dieser Zellpopulationen zeigten keinen signifikanten Unterschied. Abbildung 9 verdeutlicht die Lage der Mobilitätsspektren von Thymozyten und T-Lymphozyten des gleichen Kindes. Das Mobilitätsprofil der Thymozyten zeigt wie auch bei den übrigen 4 Messungen (Mobilitätsspektren hier nicht demonstriert) eine Schulter bzw. kleine Nebenmaxima in einem Mobilitätsbereich, der sich mit dem peripherer T-Zellen überschneidet. Der Anteil dieser im elektrischen Feld schnell wandernden Zellen am Gesamtsignal ist gering.

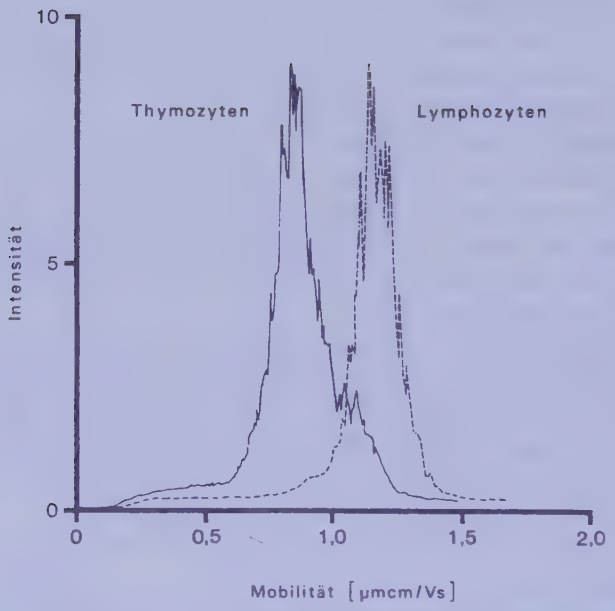

Abb. 9: Elektrophoretisches Mobilitätsspektrum von Thymozyten (———) und peripheren T-Lymphozyten (-----) eines 7-jährigen Kindes. Das Thymusgewebe und die Blutprobe wurden am gleichen Tag anläßlich einer Thorakotomie entnommen. Das Mobilitätsprofil ist repräsentativ für alle 5 an Thymozyten durchgeführten Messungen.
Die beiden Mobilitätsmaxima sind deutlich getrennt, eine sehr kleine Thymuszellpopulation wandert im Mobilitätsbereich reifer T-Zellen. Die Kontamination der Thymozytensuspension mit Lymphozyten des peripheren Bluts liegt unter 1 % (siehe Text).

Die Thymozyten, die aus dem teilweise altersinvolutierten Thymus eines erwachsenen Patienten gewonnen wurden, unterscheiden sich weder hinsichtlich des Mobilitätsprofils noch der EPM des Maximums (in Abb. 5 mit "I" gekennzeichnet) in signifikanter Weise von Thymozyten aus den 4 nicht involutierten (kindlichen) Organen.

5.4 Mitogen-Stimulation von Lymphozyten

4-stündige Inkubation von Lymphozyten mit 1.6 und 16 µg/ml PHA in zwei Fällen führte zu keiner signifikanten Änderung der EPM. Nach PHA - Stimulation und dreitägiger Kulturdauer war die EPM der transformierten und proliferierenden peripheren T-Zellen von drei Myasthenia gravis Patienten und zwei gesunden Probanden um zwischen 10.7 und 20.5 % (Mittel 17.2 %) niedriger als die EPM der unstimulierten, nicht inkubierten Lymphozyten (Tabelle 5, Abb.10).
Bei den zwei parallel durchgeführten Kulturen (Nr.1 und 2 in Tab. 5 und Abb.10) war die prozentuale Verminderung der EPM praktisch identisch (20.5%, 20.3%). Dagegen bestand ein großer Unterschied in der prozentualen Verlangsamung stimulierter Lymphozyten gegenüber dem Ausgangswert (16.3 %, 10.7%) bei zwei im Abstand von einem halben Jahr durchgeführten Kulturen mit Lymphozyten des gleichen Probanden (Nr. 1 und 2, Tab. 5 und Abb.10).
In einem Fall (Nr.6) führte die dreitägige Inkubation von Lymphozyten ohne vorhergehende Mitogenstimulation zu einer Mobilitätsabnahme der Zellen um 2.5 % gegenüber dem Ausgangswert, verglichen mit einer durchschnittlichen Abnahme von 17.2 % nach PHA - Stimulation.
Die EPM stimulierter Lymphozyten des gleichen Probanden betrug während der Rückbildungsphase der Transformation - am Tag 7 der Kultur - μ = 1.12 µmcm/Vs und zeigte somit einen Wiederanstieg gegenüber der EPM zum Zeitpunkt maximaler Proliferation am 3. Kulturtag (μ = 1.08 µmcm/Vs) (Tab. 5, Abb.10).

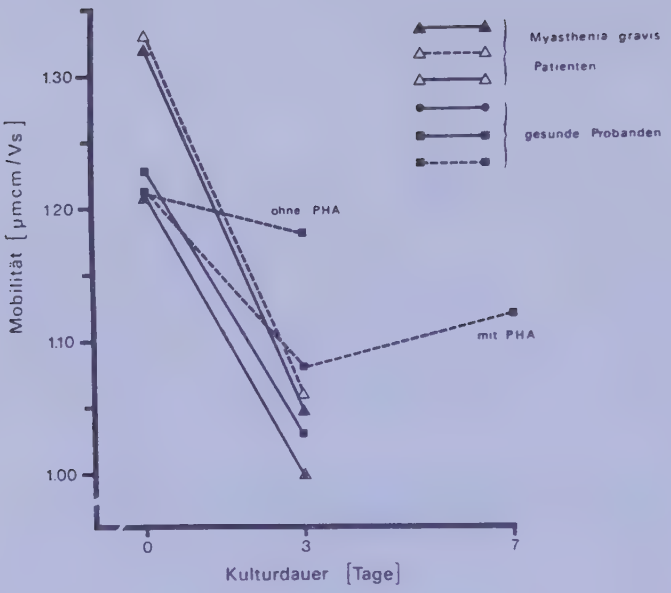

Abb. 10: Elektrophoretische Mobilität von T-Lymphozyten vor und nach Mitogen(PHA)-induzierter Blastentransformation in Kurzzeit-Makrokulturen.

Patient	Alter(Jahre) Geschlecht	E P M (µmcm/Vs) Lymphozyten vor Mitogenzugabe	Kultur-dauer (Tage)	Mitogen	E P M (µmcm/Vs) Lymphozyten aus Makrokultur	Verlang-samung (%)	Klinische Angaben
1. J.H.	69 w	1.32	3	PHA	1.05	20.5	Myasthenia gravis Ø Therapie
2. F.M.	58 m	1.33	3	PHA	1.06	20.3	
3. P.W.	nb nb	1.21	3	PHA	1.00	17.4	
4. M.Y.	25 m	1.21	3	PHA	0.99	18.2	Gesunde Probanden
5. O.O.	24 m	1.23	3	PHA	1.03	16.3	
6. O.O.	24 m	1.21	3	Ø	1.18	2.5	
			3	PHA	1.08	10.7	
			7	PHA	1.12	7.4	

Tabelle 5: Elektrophoretische Mobilitäten peripherer Lymphozyten vor und nach mitogeninduzierter Proliferation

5.5 Myeloische Zellreihe

5.5.1 Granulozyten und granulopoetische Vorläuferzellen

Segmentkernige Granulozyten von 6 gesunden Personen hatten eine mittlere EPM von $\bar{\mu} = 0.82 \pm 0.04$ µmcm/Vs bei einer den T-Lymphozyten entsprechenden HWB. Abbildung 11 zeigt das Mobilitätsspektrum einer mit Erythrozyten kontaminierten Granulozytensuspension nach Dextran-Sedimentation, vor Abtrennung der roten Blutkörperchen durch Gradienten-Zentrifugation über Percoll.

Eine durch Ficoll-Hypaque Zentrifugation aus peripherem Blut separierte Leukozytensuspension eines 47-jährigen CML-Patienten in der chronischen Erkrankungsphase, in der Myelozyten auf ca. 60% der Zellen angereichert waren, ergab das in Abb. 12 (oberer Bildteil) gezeigte Mobilitätsspektrum. Die mittlere EPM des Hauptpeaks ist $\mu = 1.00$ µmcm/Vs, ein kleines Nebenmaximum bei $\mu = 1.25$ µmcm/Vs ist ebenfalls zu erkennen.
Die elektrophoretische Untersuchung des nicht aufgetrennten Vollbluts zeigte ein bimodales Mobilitätsspektrum; zusätzlich zu dem normalen Meßsignal der Erythrozyten bei $\mu = 1.15$ µmcm/Vs war ein kleines Mobilitätsmaximum bei $\mu = 1.00$ µmcm/Vs zu erkennen (Abb. 12, unterer Bildteil), daß den Leukozyten des hochleukämischen Patienten entspricht.

Mobilitätsspektren von Ficoll-Hypaque - isolierten peripheren Leukozyten während des Blastenschubs bei 2 CML-Patienten sind in den Abbildungen 13 und 14 (oberer Bildteil) dargestellt; sie sind gegenüber der chronischen Phase (Abb.12) deutlich verbreitert und zeigen eine Zunahme von Zellen höherer EPM. In einem Fall stammen die Leukozyten der chronischen Phase und die des Blastenschubs von demselben 47-jährigen CML-Patienten.

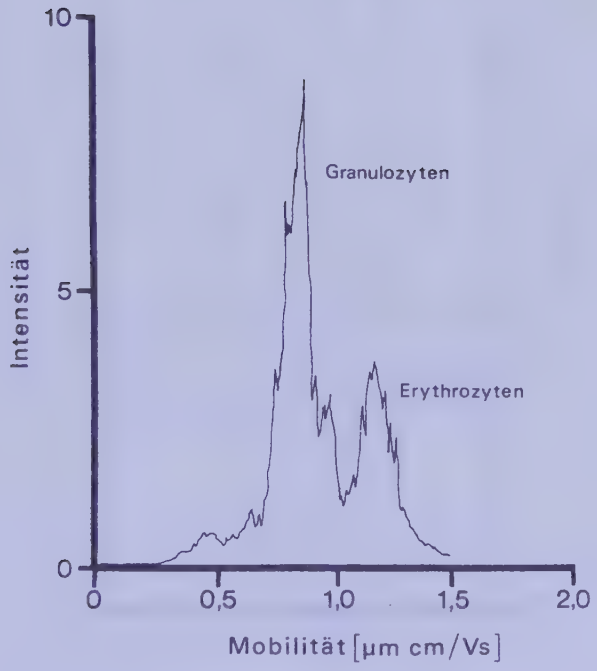

Abb. 11: Mobilitätsspektrum einer durch Erythrozyten kontaminierten Granulozytensuspension nach Dextran-Sedimentation. Die Erythrozytenzahl kann durch anschließende Gradienten-Zentrifugation über Percoll weiter reduziert werden.

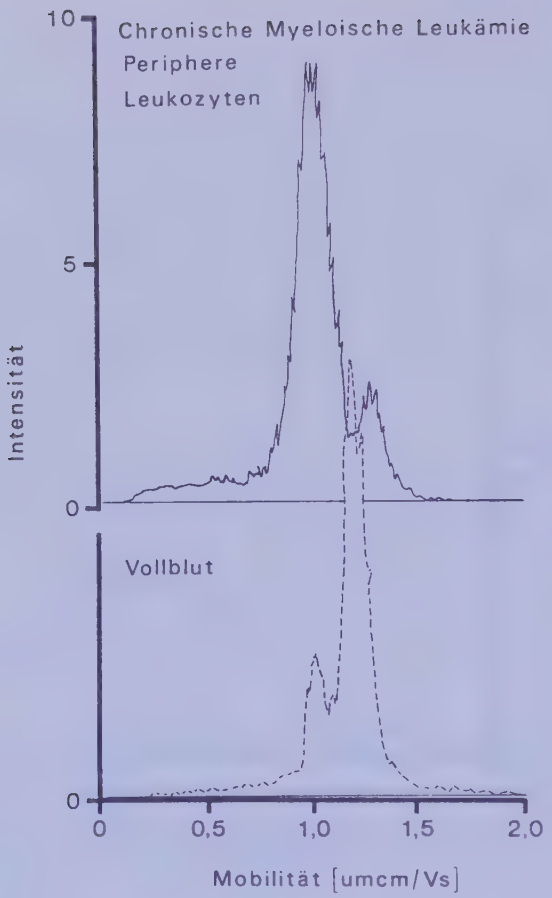

Abb. 12: Elektrophoretische Mobilitätsspektren von gewaschenem Vollblut und einer durch Ficoll-Hypaque Gradienten-Zentrifugation gewonnene Leukozytensuspension eines 47-jährigen Patienten mit CML (chronische Phase). Das von der Mobilitätsverteilung der Erythrozyten abzugrenzende Signal bei μ = 1.00 µmcm/Vs (unterer Bildteil) wird hervorgerufen durch die Leukozyten bei massiver Leukozytose. Die Meßsuspension nach Abtrennung der Erythrozyten (oberer Bildteil) enthielt Lymphozyten und myeloische Vorstufen; Myelozyten dominierten mit ca. 60% der Zellen.

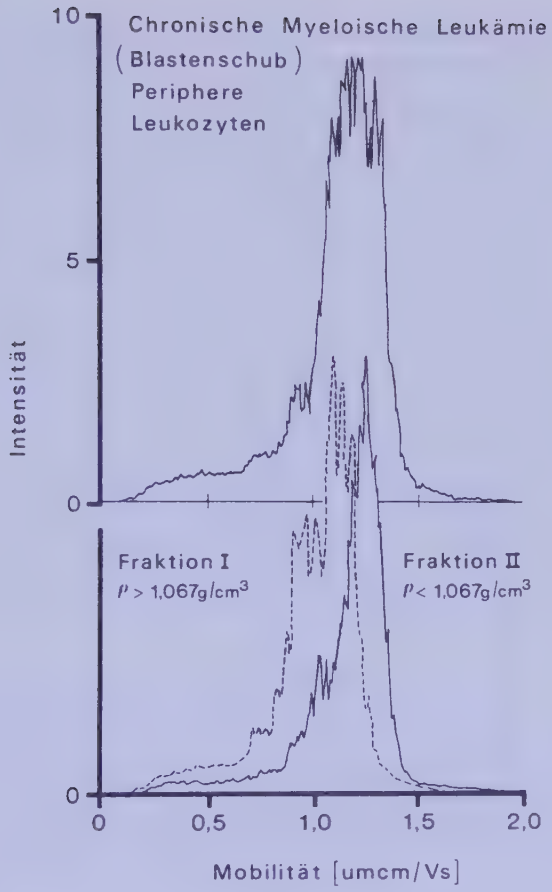

Abb. 13: Mobilitätsspektren granulopoetischer Vorläuferzellen im Blastenschub einer CML. Es handelt sich um den gleichen Patienten wie in Abb. 12, die Messungen liegen sieben Wochen auseinander.
Oberer Bildteil: Die über Ficoll-Hypaque separierte Leukozytensuspension enthielt vor allem Myelozyten, Promyelozyten und Blasten.
Unterer Bildteil: Durch weitere Auftrennung der Zellen in einem Dichtegradienten wurde eine fast homogene Blastensuspension (Fraktion II) isoliert. Fraktion I enthielt wie die Ausgangssuspension alle myeloischen Vorstufen, bei vermindertem Blastenanteil.

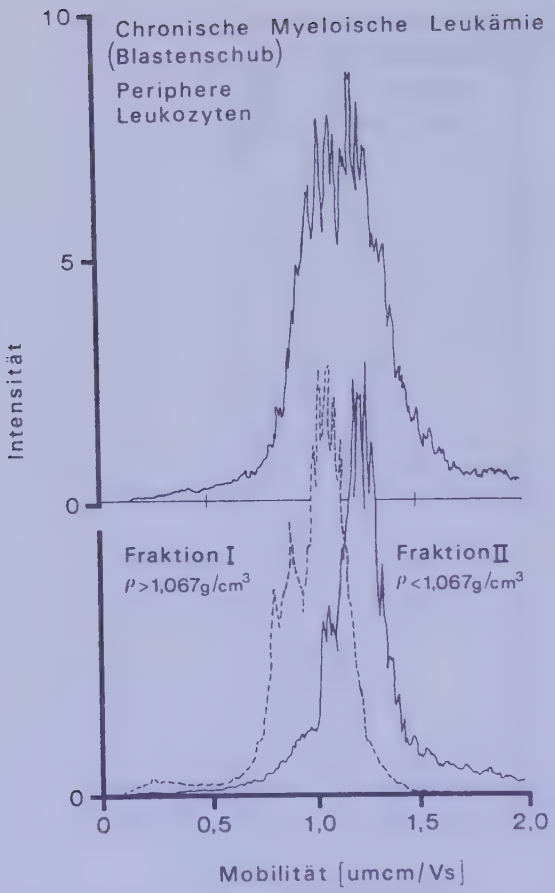

Abb. 14: Mobilitätsspektren granulopoetischer Vorläuferzellen einer 68 jährigen Patientin im Blastenschub einer CML. Die einzelnen Meßsuspensionen wurden isoliert wie bei Abb. 13 und im Text beschrieben. Die mit Abstand am zahlreichsten Zellen waren CML-Blasten.

Bei beiden Patienten im Blastenschub waren in den Meßsuspensionen die Blasten der vorherrschende Zelltyp. In der Zellsuspension, deren Mobilitätsverteilung in Abb. 13 (oberer Bildteil dargestellt ist, sind Promyelozyten und Myelozyten die nächsthäufigen Zelltypen; die dem Mobilitätsspektrum in Abb. 14 (oberer Bildteil) zugrundeliegende Meßsuspension enthält neben Blasten eine kleinere Zahl von Promyelozyten, Myelozyten, sowie Metamyelozyten.

In beiden Fällen wurde durch anschließende Gradienten-Zentrifugation eine fast homogene Blastensuspension (Fraktion II, Abb. 13 und 14) gewonnen und elektrophoretisch gemessen. Die elektrophoretischen Mobilitäten betrugen μ = 1.25 µmcm/Vs (Abb. 13) und μ = 1.23 µmcm/Vs (Abb. 14). Die Mobilitätsspektren der Zellen höherer Dichte (Fraktion I, Abb. 13 und 14) zeigen deutlich die Verarmung an Zellen höherer Mobilität, entsprechen aber im niedrigen Mobilitätsbereich denen der Ausgangssuspensionen.

5.5.2 Myeloblasten bei akuter myeloischer Leukämie (AML)

Myeloblasten eines 67-jährigen Patienten mit einer AML vom Typ FAB M 2 hatten eine eingipflige, bei einer HWB von 0.27 µmcm/Vs auffallend breite, Mobilitätsverteilung mit einer EPM von μ = 1.18 µmcm/Vs.

Myeloblasten eines 8-jährigen Kindes mit einer AML vom Typ FAB M 1 hatten eine EPM von μ = 1.25 µmcm/Vs, die HWB der Mobilitätsverteilung betrug 0.2 µmcm/Vs.

6. DISKUSSION

6.1 Periphere Lymphozyten hämatologisch gesunder Personen

Die elektrophoretische Mobilität der Lymphozyten ist ein Maß für ihre integrale Oberflächenladung und ergibt sich als Summation zahlreicher positiv und negativ geladener Gruppen. Makromolekulare Träger dieser chemischen Gruppen scheinen membrangebundene Glykoproteine, Oberflächenimmunglobuline und Lipoproteine zu sein (Benedetti und Emmelot, 1967; Roelants, 1972, Donner und Mehrishi, 1978), wobei allerdings der Beitrag der Lipoproteine zur EPM, wie der der Mukopolysaccaride, vernachlässigbar klein sein soll (Zeiller et al.,1975)

Membranproteine modulieren in Form von Antigenrezeptoren, Histokompatibilitätsantigenen etc. die spezifischen Reaktionen der Lymphozyten auf immunologische Stimuli (Greaves, 1975); sie determinieren den für verschiedene Lymphozytenpopulationen (T- und B-Zellen) und Subpopulationen (z.B. T-Helfer und T-Suppressor Zellen) charakteristischen Oberflächenphänotyp. Folglich ist anzunehmen, daß diese charakteristischen Oberflächenmerkmale mit bestimmten elektrokinetischen Eigenschaften der Zellen korrelieren.
Die zahlreichen elektrophoretischen Messungen an Lymphozyten von Erwachsenen und Kindern bestätigen diese Erwartung, indem für einzelne Lymphozytenpopulationen (T- und B-Zellen) spezifische Mobilitätswerte ermittelt wurden.

Die Zuordnung der Zellen höherer EPM zu den T-Lymphozyten und der langsamer wandernden Zellen zu der B-Zell Population ist beim Menschen vielfach dokumentiert, sowohl bei gesunden Probanden (Sabolovic´et al., 1972; Donald und Hutchinson, 1974; Stein, 1975; Smith et al., 1976), als auch bei Patienten mit Thymusdysplasie bzw. Agammaglobulinämie vom Bruton-Typ. Diese Patienten zeichnen sich durch ein fast vollständiges Fehlen der T- bzw. B-Lymphozyten aus, die Mobilitätsspektren ihrer

Lymphozyten weisen dementsprechend ein einziges Maximum niedriger (bei Thymusdysplasie) bzw. hoher (Bruton-Agammaglobulinämie) Mobilität auf (Wiig, 1975).
Eigene Messungen an T-Lymphozyten, die isoliert wurden durch Rosettenbildung mit Schafserythrozyten (Jondal, 1976) und anschließender Gradienten-Zentrifugation über Ficoll-Hypaque (Kaplan et al., 1979) ergaben in Übereinstimmung mit den genannten Untersuchungen eine eingipflige Mobilitätsverteilung im Bereich hoher EPM (hier nicht demonstriert).
Die prozentuale Verteilung von B-und T-Lymphozyten im peripheren Blut (15 - 30% gegenüber 68 - 81%) (Brown und Greaves, 1974) ist ebenfalls im Einklang mit dem beobachteten Verhältnis der Signalintensitäten der langsam und schnell wandernden Zellpopulationen. Eine Quantifizierung der aus Vollblut isolierten Lymphozytenpopulationen mittels Zellelektrophorese erscheint allerdings nicht möglich. Die starke Variabilität der Signalintensität der Zellen niedriger EPM, sowie ihr fast völliges Fehlen in ca. 21 % der elektrophoretischen Mobilitätsspektren der Kinder- und Erwachsenengruppe weisen auf z.T. erhebliche, präparationsbedingte Zellverluste hin, die vorwiegend bei der Elimination der Thrombozyten und Monozyten erfolgt sein dürften. Dieser Präparationsschritt ist aber nicht zu vermeiden, da aufgrund ihrer niedrigen EPM Thrombozyten ($\bar{\mu}$ = 0.79 µmcm/Vs), Monozyten (Schubert et al., 1973) und Granulozyten ($\bar{\mu}$ = 0.86 µmcm/Vs) das B-Zell Signal verfälschen würden.

Die höhere negative Nettoladung der T-Lymphozyten und ihre folglich höhere EPM gegenüber B-Zellen wird in erster Linie auf eine größere Zahl von Neuraminsäuremolekülen zurückgeführt (Mehrishi, 1972). Gestützt wird diese Annahme durch eine bei T-Lymphozyten stärker als bei B-Zellen ausgeprägte Verminderung der EPM nach Inkubation der Zellen mit Neuraminidase (Wiig, 1974). Despont et al.(1975) zeigten allerdings, daß weder der totale Neuraminsäuregehalt der Lymphozyten noch die Menge der durch Neuraminidase freigesetzten Neuraminsäure mit der EPM der Zellen korrelieren.

In Übereinstimmung hiermit fanden Häyry et al.(1975) bei B- und T-Lymphozyten der Maus keinen Unterschied im Neuraminsäuregehalt und postulierten, daß durch die hohe Dichte von Oberflächenimmunglobulinen auf B-Lymphozyten ein Teil der Neuraminsäurereste maskiert wird. Tatsächlich stellten Zeiller et al.(1976) eine Zunahme der EPM von Mäuse-B-Zellen fest, wenn diese unter capping-Bedingungen ihre Oberflächenimmunglobuline verloren. Bei Reexpression der Immunglobuline durch die Zellen war die Mobilitätsveränderung reversibel.

Der überraschenderweise signifikante Mobilitätsunterschied zwischen den untersuchten T-Lymphozyten von Erwachsenen und Kindern wirft die Frage auf nach einem Zusammenhang mit der Grundkrankheit der Kinder oder dem Alter als hervorstehender Variable. Bislang sind alle Überlegungen hierzu spekulativ und unbefriedigend. Asthma bronchiale, Endogenes Ekzem und Pollinosis gehören zur Gruppe der atopischen Erkrankungen, für deren Pathogenese keine Störung der zellulären Immunität verantwortlich gemacht wird. Symptome eines T-Zell Defekts fehlten in allen Fällen, die Lymphozytenmobilität des Kindes mit Herzvitium stimmte überein mit der der übrigen Kinder. Verschiebungen der Relation von T-Suppressor und T-Helfer Zellen zugunsten der Suppressor-Zellen mit zunehmendem Alter sind beschrieben worden (Cobleigh et al.,1980), Kinder waren in dem untersuchten Kollektiv aber nicht enthalten. Da zudem die Suppressor-Zellen eine niedrigere EPM als Helfer-Zellen haben sollen (Kaplan et al.,1979), wäre umgekehrt eine mit zunehmendem Alter abnehmende EPM zu erwarten.

Eine Diskriminierung zwischen T-Zell Subpopulationen allein aufgrund elektrophoretischer Messungen erscheint im Gegensatz zu dem Bericht von Kaplan et al.(1979) nicht möglich angesichts der geringen Halbwertsbreite des T-Zell Signals, die sich mit 0.14 $\pm$ 0.03 µmcm/Vs kaum von der HWB monoklonaler CLL-Lymphozyten (0.13 $\pm$ 0.03 µmcm/Vs) unterscheidet. Eine derartige Auftrennung von Subpopulationen ist zu erzielen, indem die Netto-Oberflächenladung bestimmter Zellpopulationen durch die Anlagerung von monoklonalen Antikörpern modifiziert wird (Hansen und Hannig, 1982).

6.2. Chronisch lymphatische Leukämie (CLL)

6.2.1 Klinische Grundlagen

Das klinische Bild der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) resultiert aus einer Akkumulation immunologisch inkompetenter Lymphozyten (Dameshek, 1967) im peripheren Blut, Knochenmark und in lymphatischen Geweben. Nach Lennert (1978) wird die CLL zu der Gruppe der non-Hodgkin Lymphome gerechnet. Die Ätiologie ist unbekannt. Überwiegend erkranken Männer (ca. 3 : 1) und nur 10 % der Patienten sind unter 50 Jahren (Markowitz et al., 1984).

Die Diagnose beruht auf einer anhaltenden Lymphozytose von mehr als 15000 Zellen/mm^3 und einem hyperzellulären Knochenmark mit mehr als 40 % Lymphozyten. Lymphknotenschwellungen und eine Hepatosplenomegalie sind häufig, 20 - 30 % der Patienten haben eine autoimmunhämolytische Anämie. In späteren Phasen der Erkrankung entsteht bei der Mehrzahl der Patienten eine Hypogammaglobulinämie, im Laufe derer es zu einem Antikörpermangelsyndrom mit Prädisposition zu schweren Infektionen kommt. Selten ist dagegen eine monoklonale Gammopathie mäßigen Ausmaßes, meist mit IgM oder IgG Erhöhung (Markowitz et al., 1984).

Zur Beurteilung der Prognose bei individuellen Patienten hat sich die Rai-Klassifikation (Rai et al., 1975) bewährt. Im Stadium 0 besteht lediglich eine Lymphozytose mit einer mittleren Überlebensdauer von mehr als 150 Monaten. Stadien I und II beinhalten zusätzlich eine Lymphadenopathie bzw. Splenomegalie und/oder Hepatomegalie mit mittleren Überlebenszeiten von 101 bzw. 71 Monaten. Bei den Stadien III und IV besteht, vor allem als Ausdruck der gestiegenen Tumormasse, eine Anämie bzw. Thrombozytopenie, die Prognose ist bei einer mittleren Überlebensdauer von 19 Monaten deutlich verschlechtert (Hurd, 1983). Eine Therapie wird angesichts des oft langfristigen natürlichen Verlaufs im allgemeinen nur bei Patienten mit aktiver Erkrankung in den Stadien III oder IV durchgeführt, u.U. auch im Stadium II mit beeinträchtigender lokaler Symptomatik, z.B. eine Radiatio bei zervikalen Lymphknotenschwellungen. Trotz symptomatischer Behandlungserfolge scheint allerdings das wichtigste Merkmal

der Erkrankung, die progrediente Immuninkompetenz, die sich am fallenden Gammaglobulingehalt des Serums zeigt, weder aufzuhalten noch reversibel zu sein (Wiltshaw, 1977).

6.2.2 Immunologische Charakteristika

Die CLL repräsentiert in ca. 94 % der Fälle eine monoklonale Proliferation von Oberflächenimmunglobulin-positiven ($SmIg^+$) B-Lymphozyten. Das SmIg ist meist eine μ- oder Δ-Schwerkette, die mit einer monoklonalen κ - oder λ-Leichtkette assoziiert ist (Foon et al., 1982). Weitere Indikatoren für die Zugehörigkeit zur B-Zellreihe sind Rezeptoren für Mäuseerythrozyten, das Ia-artige Antigen, sowie Rezeptoren für C'3 und das F_c-Fragment von Immunglobulinen (Brouet und Seligmann, 1977). Häufig besteht eine Kreuzreaktivität mit Anti-T-Zell Seren (Munker et al., 1983).

Bei ca. 4 % der CLL-Patienten wird eine Proliferation von T-Lymphozyten gefunden, erkennbar am Fehlen von SmIg, dem Nachweis von Rezeptoren für Schafserythrozyten (Bildung von E-Rosetten) und der Reaktivität mit hochspezifischen, monoklonalen Anti-T-Zell Antikörpern (Reijden et al.,1981; Foon et al.,1982). Auch in diesen Fällen soll die Neoplasie monoklonalen Charakter haben (Greaves et al., 1981) und ihre Zellen sollen entweder einen Helfer- oder Suppressorphänotyp haben (Dighiero et al.,1981; Foon et al.,1982).

Etwa 2 % der Fälle von CLL können keiner dieser Zellreihen zugeordnet werden (Reijden et al., 1982).

Während T-CLL Zellen ihrem Oberflächenantigenmuster nach vorwiegend reifen T-Lymphozyten ähneln (Thiel, 1983), haben die Zellen bei B-CLL eine im Vergleich zu normalen B-Lymphozyten vielfach niedrigere Dichte an SmIg (Dighiero et al., 1981). Ihr Oberflächenantigenmuster, meist IgM^+, IgD^+ erinnert an den Phänotyp früherer Reifungsstufen der normalen B-Zell Entwicklung, die durch das sequentielle Auftreten von IgM, IgD und zuletzt IgG gekennzeichnet ist (Vitetta und Uhr,1977; Gathings et al., 1977). Hierauf basiert die Theorie der B-CLL als Akkumulation

von Lymphozyten, deren Ausreifung auf einer frühen, individuell unterschiedlichen Stufe der B-Zell Entwicklung stehengeblieben ist ("Reifungsarrest") (Salmon und Seligmann,1974; Dighiero et al., 1981). Dieser Theorie zufolge könnte die Kenntnis der genauen Differenzierungsstufe einer B-CLL von prognostischer Bedeutung sein. Mehrere Untersuchungen zeigten eine Assoziation zwischen einem nieder-differenzierten Phänotyp und einem aggressiven biologischen Verhalten der CLL. Aussagen über den Differenzierungsgrad der Lymphozyten wurden von den Autoren anhand funktioneller Eigenschaften der Zellen, wie der Reaktivität bei Mitogenstimulation (Robert et al., 1980) und anhand des SmIg-Musters der Lymphozyten (Ligler et al.,1983; Kettman et al.,1983) getroffen.

6.2.3 Bisherige elektrokinetische Untersuchungen

Die wenigen vorliegenden Untersuchungen über die elektrophoretische Mobilität von Lymphozyten bei CLL bedienten sich überwiegend manueller Meßmethoden.
Thomson und Mehrishi (1969), sowie Lichtman und Weed (1970) konnten bei 13 bzw. 10 Patienten keinen signifikanten Unterschied zwischen Lymphozyten bei CLL und normalen (T?) Lymphozyten feststellen. Wiig (1975) fand bei einem CLL Patienten eine EPM zwischen der normaler B-und T-Lymphozyten, Goldstone et al. (1974) beobachteten bei 4 Patienten mit CLL eine unimodale Mobilitätsverteilung mit einer EPM die niedriger als bei normalen T-Lymphozyten war und vermutlich der EPM normaler B-Lymphozyten entsprach. Ähnliches wurde von Schubert et al., (1973) berichtet, der zwischen Leukozyten bei zahlreichen hämatologischen Erkrankungen und den entsprechenden normalen Zellen keine Unterschiede in der EPM feststellte. Sabolovic´ et al.,(1973) beschrieben 3 Typen von CLL, die anhand hoher, mittlerer und niedriger EPM differenziert werden konnten.
Über die Beziehung zwischen EPM und verschiedenen Ausreifungsstufen normaler B-Lymphozyten liegen ebenfalls nur sehr wenige Ergebnisse vor. Osmond et al.,(1975) und Zeiller et al.,(1976) demonstrierten zwar bei Mäusen eine unterschiedliche EPM bei

verschiedenen vermeintlichen B-Zell Vorstufen, doch waren diese nach heutiger Auffassung unzureichend charakterisiert (Pretlow und Pretlow, 1979).

6.2.4 Interpretation der Versuchsergebnisse

Die monoklonale Proliferation von Lymphozyten bei der CLL läßt eine unimodale Mobilitätsverteilung erwarten, wie sie in 14 der 16 Messungen auch beobachtet wurde. Es überrascht dagegen, daß die HWB der Mobilitätsverteilung bei CLL-Lymphozyten mit 0.13 $\pm$ 0.03 µmcm/Vs nicht nennenswert kleiner ist als die der mehrere Subpopulationen umfassenden T-Lymphozyten (0.14 $\pm$ 0.03 µmcm/Vs). Elektrophoretische Mobilitätsprofile sind für den Nachweis der Monoklonalität einer Zellpopulation folglich nicht ausreichend.
Bei 2 CLL-Patienten trat zusätzlich zu dem dominierenden Mobilitätspeak ein zweites, kleines Meßsignal auf, das 5 -10% des Gesamtsignals entsprach. In einem Fall lag der Mobilitätswert mit μ = 0.76 µmcm/Vs im Mobilitätsbereich von Thrombozyten und deutet somit auf eine Kontamination der Meßsuspension durch Blutplättchen hin. Bei dem zweiten Patienten (Nr.2, Tab.3 und 4) lag der Mobilitätswert des zusätzlichen Meßsignals (μ = 1.24 µmcm/Vs) im Mobilitätsbereich normaler T-Lymphozyten und war von der Mobilitätsverteilung der dominierenden Zellpopulation gut abzugrenzen. Die immunologische Analyse der Gesamtlymphozytenpopulation ergab eine B-CLL aufgrund von 86% SmIg-positiven und 94% HLA-DR positiven Zellen; zusätzlich wurde eine T-Zellmarker tragende Lymphozytenpopulation nachgewiesen, die für das Meßsignal im T-Zell Bereich verantwortlich sein dürfte.
Der bei der Immunfluoreszenzuntersuchung gefundene hohe Prozentsatz von Lymphozyten, die mit den Anti-T-Zell Antikörpern OKT3, E-Ros.-Rez., Leu3a, Leu2b, OKT8 reagierten (14 - 46%), ist indes in schlechter Übereinstimmung sowohl mit der geringen Signalgröße des Nebenpeaks als auch mit dem Befund von 86% $SmIg^+$ Zellen, zumal eine Kreuzreaktivität von B-CLL Zellen mit diesen monoklonalen Antikörpern nicht beschrieben ist.

Die zwei auffälligsten Resultate sind die erhebliche Patienten-abhängige Streuung der elektrophoretischen Mobilitätswerte, sowie die positive Korrelation zwischen EPM der CLL-Lymphozyten und dem Serum-Gammaglobulingehalt der Patienten.

Der erstgenannte Befund bestätigt die Heterogenität der B-CLL und spricht dafür, daß es bei der CLL ein kontinuierliches Spektrum von Varianten gibt. In Anlehnung an die Beobachtung von Salmon und Seligmann (1974), daß bei monoklonalen B-Zell Neoplasien die proliferierenden Zellen erhebliche Ausreifungsunterschiede aufweisen können, liegt es nahe, die beobachteten Mobilitätsunterschiede auf verschiedene Differenzierungsstufen der CLL-Zellen zurückzuführen. Zudem waren reifungsabhängige Mobilitätsveränderungen in der myeloischen und in der T-Zell Reihe beobachtet worden. Die Bedeutung der Oberflächenimmunglobuline ist in diesem Zusammenhang ebenfalls interessant: Reife B-Lymphozyten haben eine Oberflächendichte von Immunglobulinen, die um ein Vielfaches höher ist als bei B-CLL Zellen (Slease et al., 1979). Letztere wiederum weisen untereinander qualitative und quantitative Unterschiede der Oberflächenimmunglobuline auf, die Ausdruck unterschiedlicher Differenzierungsstufen sein sollen (Vitetta et al., 1977; Ligler et al., 1983). Da die EPM von B-Zellen auch beeinflußt wird durch den Gehalt an membrangebundenen Immunglobulinen (Verarmung geht mit Anstieg der EPM einher)(Zeiller et al., 1976), sowie ihrer qualitativen Zusammensetzung (Dumont et al., 1979), erscheint eine Beziehung zwischen EPM und den unterschiedlichen Differenzierungsstufen der - normalen und neoplastischen - B-Lymphozyten möglich. Es ist bisher nicht zu entscheiden, ob die Variabilität der Membranglobulin-Zusammensetzung allein die große Streubreite der Lymphozytenmobilitäten bei der CLL erklären kann, oder ob zusätzliche, reifungsabhängige oder reifungsunabhängige, Unterschiede der Membranstrukturen berücksichtigt werden müssen. Zur Analyse dieser Fragestellung wäre die Kenntnis des Differenzierungsgrades der CLL-Zellen unumgänglich. Ihre Bestimmung, z.B. durch

Charakterisierung des Immunglobulinmusters der Zellmembran wie von Kettman et al.(1983) beschrieben, war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Diese Autoren fanden, daß ein wenig differenzierter Zellphänotyp bei der B-CLL mit einem aggressiven Krankheitverlauf und einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium mit entsprechend schlechter Prognose verbunden ist. Indirekte Hinweise auf den zellulären Ausreifungsgrad wären demzufolge durch prognostisch relevante klinische Parameter gegeben. Es war jedoch keine Beziehung zu erkennen zwischen der EPM der Lymphozyten und dem Erkrankungsstadium nach Rai, der Geschwindigkeit der klinischen Progression oder der Höhe der Lymphozytose. Die Möglichkeit einer Verfälschung dieser Ergebnisse durch die bei 9 der 16 Patienten durchgeführte Chemotherapie muß berücksichtigt werden, obwohl die mittlere EPM der Lymphozyten beider Patientengruppen gut übereinstimmen.

Die Interpretation des zweiten Befundes, der Korrelation zwischen EPM der CLL-Lymphozyten und dem Gammaglobulinspiegel des Patientenserums, wirft erhebliche Probleme auf. Es erscheint bemerkenswert, daß die Lymphozyten, deren elektrokinetischer Oberflächenphänotyp den normalen B-Zellen am ähnlichsten ist, die eingeschränkteste Immunglobulin-Synthesekapazität zu besitzen scheinen. Die pathogenetischen Mechanismen, die für die Hypogammaglobulinämie und ihre meist stete Progression verantwortlich gemacht werden, reichen zur Erklärung dieses Phänomens gegenwärtig nicht aus. Dies sind sowohl eigenständige, aber nicht präzis definierte B-Zell Defekte (Hersey et al., 1980), als auch funktionelle Defekte der T-Helfer Zellen (Chiorazzi et al., 1979) und Veränderungen der normalen Relation von T-Suppressor zu T-Helfer Zellen zugunsten der T-Suppressor Population, allein oder in Kombination mit den anderen Faktoren (Platsoucas et al.,1982). Eine unspezifische Anlagerung der Serumglobuline an die Zelloberfläche würde höchstens zu einer Verlangsamung führen können und dürfte als Erklärung nicht in Frage kommen (Zeiller et al., 1976).

Inwieweit im Verlauf der Erkrankung Änderungen des Zellphänotyps erfolgen, wie von Stockdill et al.(1983) bei einigen Patienten beobachtet, und ob solche Fluktuationen mit Mobilitätsänderungen der Zellen einhergehen und dadurch die Beziehung zwischen EPM und Gammaglobulinspiegel erklären, ist Spekulation. Im Abstand von einigen Wochen wiederholte Mobilitätsmessungen an Lymphozyten von 2 CLL-Patienten zeigten keine signifikanten EPM-Unterschiede zueinander; längerfristige Verlaufsbeobachtungen wären hier von besonderem Interesse.

Ein Patient mit immunologisch gesicherter T-CLL vom Suppressor-Typ wies ebenfalls eine ausgeprägte Hypogammaglobulinämie auf, obwohl dies bei Patienten mit T-CLL ungewöhnlich sein soll. Dieser Befund steht aber in Einklang mit einem Bericht von Hofman et al. (1982), in dem die ausgeprägte Hypogammaglobulinämie bei einem Patienten mit T-CLL auf den Suppressor-Phänotyp der Lymphozyten zurückgeführt wurde.
Das Oberflächenantigenmuster von T-CLL Lymphozyten soll im allgemeinen dem reifer T-Zellen entsprechen (Thiel, 1983). Da die EPM der Lymphozyten des Patienten mit T-CLL 16%, die des Patienten mit angenommener T-CLL 5% unter der mittleren EPM normaler T-Zellen lag, scheint die Zellelektrophorese eine stärkere Differenzierung zwischen verschiedenen Zelltypen bei T-CLL zu ermöglichen als aufgrund immunologischer Markerstudien zu erwarten wäre.

6.3 Thymozyten

Der Thymus ist das zentrale Organ für die Differenzierung der T-Lymphozyten (Ford et al., 1966). Thymozyten haben ihren Ursprung in Knochenmarksvorläuferzellen, die auf dem Blutweg den Thymus besiedeln (Stutman, 1977), in dem es dann zur Ausbildung einer Rindenschicht mit ungefähr 90%, und einer Markzone mit ca. 10% der Thymozyten kommt. Eine Rezirkulation peripherer Lymphozyten in den Thymus soll normalerweise nicht erfolgen können (Stutman, 1978), kürzlich sind jedoch dem widersprechende Ergebnisse veröffentlicht worden (Baroni et al., 1983).
Mehrere Thymozytenpopulationen können unterschieden werden aufgrund einer unterschiedlichen Kortisonempfindlichkeit, PHA-Reaktivität, Zelldichte (Sabolovic´und Dumont, 1973), sowie anhand des Oberflächenantigenmusters, definiert durch monoklonale Antikörper (Reinherz et al., 1980). Eine kleine Population kortikaler Thymozyten ist subkapsulär lokalisiert und besteht aus großen, sich rasch teilenden, E-Rosetten-negativen Zellen,die als Thymozyten-Vorläuferzellen (Prothymozyten) angesehen werden (Galili et al., 1980), während die Mehrzahl kortikaler Thymozyten (ca. 70% aller Thymozyten) kleine, E-Rosetten-positive, kortisonempfindliche Zellen in einem Stadium mittlerer Ausreifung sind. Mit zunehmender Differenzierung nehmen diese Zellen immer mehr den Oberflächenphänotyp zirkulierender T-Lymphozyten an (Janossy et al., 1981). Reife, kortisonunempfindliche Thymozyten (ca. 10% der Gesamtzahl) sind in der Medulla lokalisiert und gelten als unmittelbare Vorläufer der peripheren T-Zellen (Zeiller et al., 1975).

Elektrophoretische Untersuchungen an Thymozyten wurden meist an Zellen der Maus durchgeführt (Sabolovic´und Dumont,1973; Zeiller et al.,1974 und 1975; Wiig,1974 und 1976; Häyry et al., 1975), selten an menschlichen Thymozyten (Wiig, 1975). Übereinstimmend wies die Majorität der Thymozyten eine im Vergleich zu peripheren T-Zellen niedrige EPM auf, eine kleine Population kortisonresistenter Thymozyten mit einer höheren

EPM, die den in der Medulla lokalisierten Thymozyten entsprechen soll, wurde von Häyry et al.,(1975) identifiziert.

Die in dieser Studie an humanen Thymozyten ermittelten elektrophoretischen Mobilitätsspektren bestätigen die bei der Maus erzielten Ergebnisse, indem bei allen Messungen eine dominierende Thymozytenpopulation niedriger Mobilität und eine kleine Zellfraktion hoher Mobilität zu erkennen war. Zusätzlich konnte demonstriert werden, daß im Rahmen der Altersinvolution des Thymus keine grundlegende Änderung des Mobilitätsspektrums der Thymozytenpopulationen auftritt.
Aus der Gesamtheit der Ergebnisse dieser elektrokinetischen Untersuchungen ist zu folgern, daß die T-Zell Reifung mit einer kontinuierlichen Zunahme der EPM einhergeht, parallel mit einem Anstieg des Neuraminsäuregehalts der Thymozyten (Despont et al., 1975). Diese Korrelation impliziert, daß die EPM in Beziehung zu setzen ist zu definierten Ausreifungsstadien der T-Zell Entwicklung.
Ein potentieller Anwendungsbereich besteht im Rahmen der Klassifizierung von T-Zell Neoplasien, bei der die Messung der EPM der Tumorzellen einen Hinweis auf den Differenzierungsgrad der Zellen (Stadium des "Reifungsarrests") geben könnte.

6.4 Mitogen - Stimulation

In-vivo führt der Kontakt eines Lymphozyten mit einem adäquaten Antigen zu seiner Aktivierung mit Änderung seines Migrationsverhaltens, Absiedlung in lymphatischen Geweben wie Lymphknoten oder Milz und dort beginnender Transformation und Proliferation (Klein, 1982). Mit zunehmender Zahl mitotischer Teilungen werden die großen transformierten Zellen ständig kleiner bis sie morphologisch der Ausgangszelle gleichen und erneut in den Kreislauf ausgeschwemmt werden. Diese Vorgänge der Antigen-Aktivierung von Lymphozyten können in-vitro unter Verwendung eines Antigens oder eines Mitogens imitiert werden.

Die gegenüber der Ausgangsmobilität um durchschnittlich 17.2% niedrigere EPM aktivierter, proliferierender Lymphozyten nach 3-tägiger Kultur ist weder durch die Anlagerung von PHA an die Oberflächenrezeptoren noch durch unspezifische, kulturbedingte Effekte hinreichend zu erklären. Die Aktivierung der Zellen scheint vielmehr charakteristische Membranveränderungen hervorzurufen, die mit einer Abnahme der Oberflächenladung und folglich der EPM einhergehen. Nicht nur die absolute Zahl bestimmter molekularer Membrankomponenten, sondern auch ihre räumliche Anordnung in der elektrokinetisch wirksamen Oberflächenschicht können die Ladungsdichte der Zelloberfläche beeinflussen. Da keine Methoden zur Verfügung stehen diese räumliche Anordnung zu analysieren, ist die Art der Membranveränderung nach Zellaktivierung ungeklärt (Zeiller et al., 1975).

Die Mehrzahl zirkulierender T-Lymphozyten sind kleine, ruhende Effektorzellen, die nach Antigenkontakt in-vivo die Transformations-, Proliferations- und Rückbildungsphase durchlaufen haben. Da für diese Zellen eine mittlere EPM von $\bar{\mu} = 1.23 \pm 0.04$ µmcm/Vs ermittelt wurde, müßten die Lymphozyten auch in-vitro ihren ursprünglichen Mobilitätswert erreichen, die Vergleichbarkeit von in-vivo und in-vitro Aktivierung vorausgesetzt. Der Wiederanstieg der EPM von 1.09 µmcm/Vs am 3. Tag

der Kultur auf 1.12 µmcm/Vs am 7. Tag zeigt, daß die Membranveränderungen auch in-vitro zumindest teilweise reversibel sind. Die recht große Differenz zwischen der Ausgangsmobilität und der EPM am 7. Kulturtag wird durch einen Vergleich mit der Kinetik der Inkorporation radioaktiven Thymidins bei PHA-stimulierten Lymphozyten verständlich. Die Aufnahme markierten Thymidins, die zwischen dem 3. und 5. Kulturtag den Maximalwert erreicht, ist auch am 7. Tag noch beträchtlich erhöht, es handelt sich also nicht um ruhende Zellen (Douglas, 1972).

Die prozentualen Unterschiede in der Verlangsamung stimulierter Lymphozyten bei 6 Stimulationsversuchen (10.7% - 20.5%), die auch bei zwei zeitlich auseinanderliegenden Versuchen mit Lymphozyten des gleichen Probanden auffallend groß waren (10.7% und 16.3 %) sind zum Teil methodisch bedingt. Verschiedene Variablen lassen sich nicht exakt konstant halten und führen von Versuch zu Versuch zu unterschiedlichen Stimulationsergebnissen. Dies sind z.B. der Anteil der Makrophagen in der Zellsuspension, der Anteil stimulierbarer Lymphozyten und die Aktivität der verwendeten PHA-Charge. Die prozentuale Verlangsamung von 10.7% in Versuch Nr.6 (Abb. 10; Tab. 5) gegenüber durchschnittlich 18.5% bei den übrigen 5 Messungen dürfte somit Ausdruck einer erheblich unter dem Stimulationsoptimum gebliebenen Stimulationsrate sein, eine parallele Messung der ^{3}H Thymidin Inkorporation konnte leider nicht durchgeführt werden.

Die Relevanz der beobachteten Mobilitätsveränderungen in-vivo ist nicht bekannt. Es wurde postuliert, daß das spezifische Migrationsverhalten lymphatischer Zellen (Ecotaxis) durch elektrostatische Phänomene gesteuert wird (Parrott und de Sousa, 1971). Wiig (1976) demonstrierte eine Änderung des Migrationsverhaltens lymphatischer Zellen nach deren Behandlung mit Neuraminidase und Protease und folgerte, daß hierdurch spezifische, für das Migrationsverhalten verantwortliche Rezeptoren demaskiert werden, ein Vorgang der mit einer

Änderung der EPM der Zellen einhergeht.

Dessen ungeachtet ist die Zellelektrophorese von potentieller Bedeutung für die Unterscheidung verschiedener Aktivierungsstufen oder Funktionszuständen von Lymphozyten und ist möglicherweise geeignet zur Quantifizierung der allogenetischen Reaktivität in "mixed lymphocyte cultures".

6.5 Myeloische Zellreihe

6.5.1 Granulozyten und granulopoetische Vorläuferzellen

Aufgrund ihrer überlappenden Dichteverteilungen lassen sich die verschiedenen myeloischen Vorläuferzellen nicht in Reinform isolieren (Olofsson et al., 1980). Eine die Interpretation der elektrophoretischen Meßergebnisse ermöglichende Anreicherung von Blasten und Myelozyten in der Meßsuspension war bedingt durch den hohen prozentualen Anteil, den Blasten und Myelozyten an den Leukozyten des peripheren Blutes eines CML-Patienten hatten. Ein Vergleich der EPM der verschiedenen myeloischen Zelltypen zeigt eine, mit zunehmender Zelldifferenzierung einhergehende, Abnahme der EPM von $\mu = 1.25$ und $\mu = 1.23$ (µmcm/Vs) für (CML-)Blasten über $\mu = 1.00$ µmcm/Vs für Myelozyten bis zu $\mu = 0.82$ µmcm/Vs für (normale) reife Granulozyten. Die Promyelozyten-reichste Fraktion (Fraktion I in Abb. 13) enthielt neben einem kleinen Blastenanteil einen großen Prozentsatz von Myelozyten; sie überspannt den Mobilitätsbereich zwischen 0.90 und 1.18 (µmcm/Vs). Die Zuordnung der Promyelozyten zu dem größeren Mobilitätsgipfel der Fraktion I ($\mu = 1.10$ µmcm/Vs; Abb.13) erscheint plausibel, ist aber spekulativ.

Die aus diesen Meßergebnissen abgeleitete Schlußfolgerung, daß eine Beziehung zwischen Differenzierungsgrad und EPM myeloischer Zellen besteht, basiert auf der Prämisse, daß myeloische Vorstufen von Leukämiepatienten und die ent-

sprechenden Zellen gesunder Personen sich nicht in ihrer EPM unterscheiden. Es wäre theoretisch möglich, daß die Oberflächenladung Ausdruck Leukämie-spezifischer, Differenzierungs-unabhängiger Membranstrukturen ist. Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, daß die hier vorgestellten Meßergebnisse auf die normale Granulopoese übertragbar sind. Lichtman und Weed (1970), sowie Schubert et al.(1973) stellten unter Verwendung unterschiedlicher meßtechnischer Verfahren (manuelle Mikroelektrophorese bzw. präparative Zellelektrophorese) in Übereinstimmung fest, daß myeloische Vorstufen aus dem Knochenmark gesunder Personen und von Patienten mit CML sich in ihrer Oberflächenladung nicht unterscheiden. Weiterhin demonstrierten Griffin et al.(1983), daß der Oberflächenphänotyp leukämischer Zellen das Antigenmuster normaler Zellen entsprechenden Differenzierungsgrades präzise "imitiert". Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse scheinen die Mobilitätsunterschiede zwischen den granulopoetischen Vorläuferzellen auf Differenzierungs-abhängige, und nicht auf Leukämie-spezifische Oberflächenveränderungen zurückzuführen sein.
Während die Blastenschubzellen bei CML meistens ein den Myeloblasten bei AML ähnelndes Erscheinungsbild haben (Janossy et al.,1976), besitzen die Blasten bei etwa einem Drittel der Patienten einen lymphatischen Phänotyp (Beard et al.,1976). Dies muß bei der elektrophoretischen Analyse von CML-Blasten berücksichtigt werden, die hier vorgestellten Meßergebnisse beziehen sich auf zytochemisch gesicherte "myeloische"Blastenschub-Zellen.

6.5.2 Myeloblasten bei akuter myeloischer Leukämie (AML)

Die akuten myeloischen Leukämien lassen sich den verschiedenen Untergruppen der FAB-Klassifikation (Bennett et al., 1976) meist gut zuordnen, differentialdiagnostische Probleme

können vor allem zwischen der M1 und M4 Gruppe, bei der Identifizierung sehr undifferenzierter Zellen und der Abgrenzung von unreifzelligen lymphatischen Leukämien auftreten. Die gemessenen EPM-Unterschiede zwischen Myeloblastensuspensionen von Leukämien des Typs M1 (μ = 1.25 µmcm/Vs) und M2 (μ = 1.18 µmcm/Vs) scheinen Ausdruck der unterschiedlichen zellulären Ausreifung zu sein; Die größere Halbwertsbreite der Mobilitätsverteilung bei dem Typ M2 (0.27 µmcm/Vs gegenüber 0.2 µmcm/Vs bei M1) steht in Einklang mit der größeren Heterogenität dieser Zellen gegenüber den Myeloblasten der Gruppe FAB M1.
Die EPM der Zellen bei den akuten Leukämien der FAB-Gruppen M3 - M6 sind noch zu ermitteln, doch weisen diese ersten Ergebnisse darauf hin, daß zellelektrophoretische Messungen als Hilfsmittel bei der Klassifikation vor allem unreifzelliger Leukämien von Bedeutung sein könnten.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die elektrokinetischen Eigenschaften zahlreicher lymphatischer (T- und B-Lymphozyten, aktivierte Lymphozyten, Thymozyten) und myeloischer (Granulozyten, granulopoetische Vorstufen bei CML, Myeloblasten bei AML) Zellen wurden mit Hilfe eines automatischen Zellelektrophoreseverfahrens auf der Basis der Laser-Doppler Spektroskopie untersucht.
Reife Blutzellen besitzen Zelltyp-spezifische elektrophoretische Mobilitäten, die in engen Grenzen ($\pm$ 3%) streuen, die aber nicht zur eindeutigen Identifizierung des Zelltyps herangezogen werden können.
Periphere Lymphozyten hämatologisch gesunder Personen haben eine bimodale Mobilitätsverteilung mit einem dominierenden Mobilitätsmaximum höherer elektrophoretischer Mobilität (EPM) ($\bar{\mu}$ = 1.23 $\pm$ 0.03 µmcm/Vs bei Erwachsenen) das den T-Lymphozyten,

und einem kleinen Meßsignal das den B-Lymphozyten entspricht ($\bar{\mu}$ = 0.92 ± 0.04 µmcm/Vs). Ein kleiner, statistisch signifikanter Mobilitätsunterschied wurde zwischen den T-Lymphozyten von Erwachsenen und von Kindern ($\bar{\mu}$ = 1.18 ± 0.01 µmcm/Vs) gefunden.
Die Hauptpopulation menschlicher Thymozyten hat eine mittlere EPM von $\bar{\mu}$ = 0.92 ± 0.05 µmcm/Vs); eine zusätzliche kleine Thymozytenpopulation höherer EPM und vermutlich höherer Ausreifungsstufe ließ sich in den Mobilitätsspektren aller Thymozytenproben abgrenzen. Die Mobilitätsverteilungen von Thymozyten aus kindlichem und aus altersinvolutiertem Thymusgewebe sind weitgehend identisch.
Lymphozyten von Patienten mit B-CLL und T-CLL haben im Einklang mit der Monoklonalität der Lymphozytenproliferation eine eingipflige Mobilitätsverteilung. Die Mobilitäten der Lymphozytenproben zeigten eine erhebliche Patienten-abhängige Streuung, die Meßwerte waren kontinuierlich verteilt zwischen µ = 0.98 und µ = 1.24 (µmcm/Vs). Eine immunologische Markeranalyse der Lymphozyten von 10 der 16 CLL-Patienten ließ keine Beziehung zwischen dem immunologischen Typ (B- oder T-Zell) der CLL und der EPM der Lymphozyten erkennen. Überraschenderweise besteht eine positive Korrelation (r = +0.83) zwischen der EPM der CLL-Lymphozyten und dem Gammaglobulingehalt des Patientenserums; die dieser Beobachtung zugrundeliegenden Faktoren konnten nicht ermittelt werden. Keine Beziehung war dagegen erkennbar zwischen der Lymphozytenmobilität und dem Erkrankungsstadium nach Rai, der biologischen Aggressivität der CLL, der Erkrankungsdauer oder der Höhe der Lymphozytenzahl. Die durchschnittliche EPM der Lymphozyten der zytostatisch behandelten Patientengruppe unterschied sich praktisch nicht von der des nicht chemotherapeutisch behandelten Patientenkollektivs.

Ähnlich den verschiedenen Entwicklungsstufen der T-Lymphozyten weisen myeloische Zellen, zumindest bei der CML, reifungsabhängige Unterschiede ihrer EPM auf. Im Gegensatz zur T-Zell Reifung, die mit einer kontinuierlichen Zunahme der EPM einhergeht, wird die zunehmende Differenzierung myeloischer Zellen von einer Mobilitätsabnahme begleitet. Diese Tendenz bestätigte sich in zwei Fällen von AML, bei denen Myeloblasten ohne weitere Differenzierungszeichen (FAB M1) eine höhere EPM hatten als Myeloblasten mit promyelozytären Differenzierungsmerkmalen (FAB M2). Mitogen-induzierte Aktivierung und Blastentransformation von T-Lymphozyten geht mit einer zumindest partiell reversiblen Mobilitätsabnahme von durchschnittlich 17.2% einher und deutet auf eine Beeinflussung der EPM der Zellen durch die Zellzyklusphase hin.

Während die automatische, analytische Zellelektrophorese als alleinstehendes Verfahren zur routinemäßigen Analyse heterogener Zellsuspensionen nicht geeignet erscheint, kann sie, in Verbindung mit etablierten Markersystemen, wichtige Beiträge zur Charakterisierung von Zellen, vor allem bei Leukämien und Lymphomen, leisten. Die elektrophoretischen Untersuchungen bei der CLL demonstrieren in eindrucksvoller Weise die phänotypischen Unterschiede zwischen Zellen, die aufgrund konventioneller immunologischer Oberflächenstudien uniform erscheinen.

8. LITERATURVERZEICHNIS

Aguado, M.T.; Pujol, N.; Rubiol, M.T.; Celada, A.: Separation of granulocytes from peripheral blood in a single step using discontinuous density gradients of Ficoll-Urografin. A comparative study with separation by dextran.
J. Immunol. Methods 32, 41-50 (1980)

Aisenberg, A.C.: Cell-surface markers in lymphoproliferative disease
N. Engl. J. Med. 304, 331-336 (1981)

Baroni, C.D., Valtieri, M., Stoppacciaro, A., Ruco, L.P., Uccini, S., Ricci, C.: The human thymus in ageing: histologic involution paralleled by increased mitogen response and by enrichment of $OKT3^+$ lymphocytes.
Immunology 50, 519-528 (1983)

Beard, M.E.J., Durrant,J., Catovsky, D., Wiltshaw,E., Amess, J.L., Brearley, R.L., Kirk, B., Wrigley, P.F.M., Janossy, G., Greaves, M.F., Galton, D.A.G.: Blast crisis of chronic myeloid leukaemia (CML)
I. Presentation simulating acute lymphoid leukaemia (ALL)
Br. J. Haematol. 34, 167-178 (1976)

Benedetti, E.L., Emmelot, P.: Studies on plasma membranes IV. The ultrastructural localization and content of sialic acid in plasma membranes isolated from rat liver and hepatoma.
J. Cell. Sci. 2: 499-512,(1967)

Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A.G. Gralnick, H.R., Sultan, C.: Proposals for the classification of the acute leukaemias.
Br. J. Haematol. 33, 451-458 (1976)

Berlin, R.D., Oliver, J.M., Ukena, T.E., Yin, H.H.: The cell surface.
N. Engl. J. Med. 292, 515-520 (1975)

Bossmann, H.B., Bieber, G.F., Brown, A.E., Case, K.R., Gersten, D.M. Kimmerer, T.W., Lione, A.: Biochemical parameters correlated with tumour cell implantation.
Nature 246, 487-489 (1973)

Bowman, W.P., Melvin, S., Mauer, A.M.: Cell markers in lymphomas and leukemias.
Adv. Intern. Med. 25, 391-425 (1980)

Bowman, W.P., Mauer, A.: The role of cell markers in the management of leukemia.
Prog. Hematol. 12, 165-185 (1981)

Bøyum, A.: Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages
Scand. J. Immunol. 5, Suppl. 5, 9-15 (1976)

Bradley, L.M.: Mitogen induced responses. In: Selected methods in cellular immunology. Ed. Mishell, B.B., Shiigi, S.M.; W.H. Freeman and Co., San Francisco, 1980 p. 156-161

Brown, G., Greaves, M.F.: Enumeration of absolute numbers of T and B lymphocytes in human blood.
Scand. J. Immunol. 3, 161-172 (1974)

Brouet, J.C., Seligmann, M.: Chronic lymphocytic leukaemia as an immunoproliferative disorder.
Clin. Haematol. 6, 169-183 (1977)

Chiorazzi, N., Fu, S.M., Moutazen, G., Kunkel, H.G., Rai, K., Gee, T.: T cell helper defect in patients with chronic lymphocytic leukemia.
J. Immunol. 122, 1087-1090 (1979)

Chollet, P., Chassagne, J., Sauvezie, B., Codegnat, J.M., Plagne, R.: Electrophoretic mobility of human lymphocytes purified by nylon wool columns and spontaneous sheep red blood cells rosetting techniques correlation with immunofluorescence.
J. Immunol. Methods 11, 25-35 (1976)

Chollet, P., Chassagne, J., Thierry, C., Sauvezie, B., Serrou, B., Plagne,R.: Isolation and electrophoretic mobility of three lymphoid populations in normal human blood.
Eur. J. Cancer 13: 333-339 (1977)

Cobleigh, M.A., Braun, D.P., Harris, J.E.: Age-dependant changes in human peripheral blood B cells and T-cell subsets: Correlation with mitogen responsiveness.
Clin. Immunol. Immunopathol. 15, 162-174 (1980)

Dameshek, W.: Chronic lymphocytic leukemia - an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes.
Blood 29, 566-584 (1967)

Despont, J.P., Abel, C.A., Grey, H.M.: Sialic acids and sialyltransferases in murine lymphoid cells: Indicators of T-cell maturation.
Cell. Immunol. 17, 487-494 (1975)

Dighiero, G., Bodega, E., Binet, J.L.: Differentiation ability of the CLL lymphocyte: An immature lymphocyte or an abnormal leukemic cell?
Blood Cells 7, 331-339 (1981)

Donald, D., Hutchinson, F., Macloed, T.M., Raffle, E.J.: Electrophoretic mobility of human lymphocytes - an investigation of the technique of cytopherometry.
J. Immunol. Methods 6, 151-156 (1974)

Donner, M., Mehrishi, J.N.: The lymphocyte surface. Differences in the surface chemistry of murine spleen lymphocytes of varying major histocompatability haplotypes.
Proc. R. Soc. Lond. B 201, 271-284 (1978)

Douglas, S.D.: Electron microscopic and functional aspects of human lymphocyte response to mitogens.
Transplant. Rev. 11, 39-59 (1972)

Doxiadis, I., Grosse-Wilde, H., Hohlfeld, R., Toyka, K.V.: Differences in antigen expression on normal thymocytes and on cells derived from hyperplastic thymi and thymoma of myasthenia gravis patients. In:"Leucocyte Typing; Human Leucocyte Differentiation Antigens Detected by Monoclonal Antibodies, Specifications-Classification-Nomenclature". Eds.: Bernard, A., Boumsell, L., Dausset, J., Milstein, C., Schlossman, S.F.; Springer Verlag Berlin, 1984 p.546

Dumont, F., Ahmed, A., Habbersett, R.: Electrokinetic properties of murine B lymphocyte subpopulations characterized by their surface-immunoglobulin phenotype. In: Cell Electrophoresis : Clinical application and methodology. INSERM Symposium No. 11, Ed. Preece, A.W., Sabolovic, D. Elsevier/North-Holland Biomedical Press (1979) p. 157-168

Foon, K.A., Schroff, R.W., Gale, R.P.: Surface markers on leukemia and lymphoma cells: Recent advances.
Blood 60, 1-19 (1982)

Ford, C.E., Micklem, H.S., Evans, E.P., Gray, J.G., Ogden, D.A.: The inflow of bone marrow cells to the thymus: studies with part body irradiated mice injected with chromosome marked bone marrow and subjected to antigenic stimulation.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 129, 283-296 (1966)

Galili, U., Schlesinger, M.: Subpopulations of human thymus cells differing in their capacity to form stable E-Rosettes and in their immunologic reactivity.
J. Immunol. 115, 827-833 (1975)

Galili, U., Polliak, A., Okon, E., Leizerovitz, R., Gamliel, H., Korkesh, A., Schenkar, J.G., Izak, G.; Human prothymocytes. Membrane properties, differentiation patterns, glucocorticoid sensitivity and ultrastructural features.
J. Exp. Med. 152, 796-807 (1980)

Gathings, W.E., Lawton, A.R., Cooper, M.D.: Immunofluorescent studies of the development of pre-B cell, B lymphocyte and immunoglobulin isotype diversity in humans.
Eur. J. Immunol. 7, 804-810 (1977)

Goldstone, A.H., Urbaniak, S.J., Irvine, W.J.: Electrophoresis of lymphocytes from normal human subjects and patients with chronic lymphocytic leukemia.
Clin. Exp. Immunol. 17, 113-120 (1974)

Greaves, M.F.: Clinical applications of cell surface markers.
Prog. Hematol. 9, 255-304 (1975)

Greaves, M.F., Delia, D., Robinson, J., Sutherland, R., Newman, R.: Exploitation of monoclonal antibodies: A "Who's Who" of hemopoietic malignancy.
Blood Cells 7, 257-280 (1981)

Griffin, J.D., Todd, R.F., Ritz, J., Nadler, L.M., Canellos, G.P., Rosenthal,D., Gallivan, M., Beveridge, R.P., Weinstein, H., Karp, D., Schlossman, S.F.: Differentiation patterns in the blastic phase of chronic myeloid leukemia.
Blood 61, 85-91 (1983)

Grinell, F.: Biochemical analysis of cell adhesion to a substratum and its possible relevance to cell metastasis. In: Membranes and Neoplasia: New approaches and strategies, pp. 227-236
Prog. Clin. Biol. Res. 9, 227-236 (1976)

Hagmar, B.: Cell surface charge and metastasis formation. A study on the effects of dextran and heparin on tumor cells and experimental metastases in a syngeneic murine system.
Acta Path. Microbiol. Scand. (Sect. A) 80, 357-366 (1972)

Hansen, E., Hannig, K.: Antigen-specific electrophoretic cell separation (ASECS): Isolation of human T and B lymphocyte subpopulations by free flow electrophoresis after reaction with antibodies.
J. Immunol. Methods 51, 197-208 (1982)

Häyry, P., Andersson, L.C., Gahmberg, C., Roberts, P., Annamari, R., Nordling, S.: Fractionation of immunocompetent cells by free-flow cell electrophoresis.
Israel. J. Med. Sci. 11, 1299- 1318 (1975)

Hersey, P., Wotherspoon, J., Reid, G., Gunz, F.W.: Hypogammaglobulinaemia associated with abnormalities of both B and T lymphocytes in patients with chronic lymphatic leukaemia.
Clin. Exp. Immunol. 39, 698-707 (1980)

Hoffmann, W., Kaufmann, R., Steiner, R., Werner, W.: Cell electrophoresis for diagnostic purposes II. Critical evaluation of conventional cytopherometry.
Br. J. Cancer 43, 598-609 (1981)

Hofman, F.M., Smith, D., Hocking, W.: T cell chronic lymphocytic leukaemia with suppressor phenotype.
Clin. Exp. Immunol. 49, 401-409 (1982)

Hurd, D.D.: The chronic leukemias. Clinical picture, diagnosis, and management.
Postgrad. Med. 73, 217-231 (1983)

Janossy, G., Greaves, M.F., Revesz, T., Lister, T.A., Roberts, M., Durrant, J., Kirk, B., Catovsky, D., Beard, M.E.J.: Blast crisis of chronic myeloid leukaemia (CML). II. Cell surface marker analysis of 'lymphoid' and myeloid cases.
Br. J. Haematol. 34, 179-192 (1976)

Janossy, G., Tidman, N., Papageorgiou, E.S., Kung, P.C., Goldstein, G.: Distribution of T-lymphocyte subsets in the human bone marrow and thymus: An analysis with monoclonal antibodies.
J. Immunol. 126, 1608-1613 (1981)

Jondal, M.: SRBC rosette formation as a human T lymphocyte marker.
Scand. J. Immunol. 5, Suppl. 5, 69-76 (1976)

Kaplan, J.H., Uzgiris, E.E.: Identification of T and B cell subpopulations in human peripheral blood: Electrophoretic mobility distributions associated with surface marker characteristics.
J. Immunol. 117, 1732-1740 (1976)

Kaplan, J.H., Uzgiris, E.E., Lockwood, S.H.: Analysis of T cell subpopulations by laser Doppler spectroscopy and the association of electrophoretic mobility differences with differences in rosette-forming affinity.
J. Immunol. Methods 27, 241-255 (1979)

Kettman, J.R., Smith, R.G., Uhr, J.W., Vitetta, E.S., Sheehan, R., Ligler, F.S., Frenkel, E.P.: Quantitative monitoring of lymphoid malignancies. Application and findings in chronic lymphocytic leukemia.
Blood Cells 9, 21-33 (1983)

Klein, J.: Immunology. The science of self - non-self discrimination.
John Wiley and Sons, Inc. (1982)

Kuhlein, E., Laurent,G., Rigal, G., Delson, G., Pris, J., Ducos, J.: Spontaneous mouse erythrocyte-rosette formation in chronic lymphocytic leukemia.
Clin. Exp. Immunol. 47, 389-395 (1982)

Lennert, K.: Malignant lymphoma other than Hodgkins disease. Springer Berlin, Heidelberg, New York, (1978)

Lichtman, M.A., Weed, R.I.: Electrophoretic mobility and N-acetylneuraminic acid content of human normal and leukemic lymphocytes and granulocytes.
Blood 35, 12-22 (1970)

Ligler, F.S., Kettman, J.R., Smith, R.G., Frenkel, E.P.: Immunoglobulin phenotype on B cells correlates with clinical stage of chronic lymphocytic leukemia.
Blood 62, 256-263 (1983)

Magrath, I.T.: Lymphocyte differentiation: An essential basis for the comprehension of lymphoid neoplasia.
JNCI 67, 501-514 (1981)

Markowitz, M.H., Mouradian, J.A., Moore, A.: Acute and chronic lymphocytic leukemias. In: Diseases of the lymphatic system. Diagnosis and Therapy.
Ed. Molander, D.W., Springer New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo (1984)

Mayhew, E., Weiss, L.: Ribonucleic acid at the periphery of different cell types and effect of growth rate on ionogenic groups in the periphery of cultured cells.
Exp. Cell Res. 50, 441-453 (1968)

Mehrishi, J.N.: Molecular aspects of the mammalien cell surface.
Prog. Biophys. Mol. Biol. 25, 1-70 (1972)

Mehrishi, J.N., Zeiller, K.: Surface molecular components of T and B lymphocytes.
Eur. J. Immunol. 4, 474-478 (1974)

Miller, R.G., Phillips, R.A.: Separation of cells by velocity sedimentation.
J. Cell. Physiol. 73, 191-202 (1969)

Mishell, B.B., Shiigi, S.M.: Selected methods in cellular immunology.
W.H. Freeman and Co. (1980)

Munker, R., Thiel, E., Kummer, U., Rodt, H., Thierfelder, S.: Crossreaction of monoclonal anti-T-cell antibodies: Implications for classifying B-cell leukemias.
Blut 46, 95-100 (1983)

Nicolson, G.L., Birdwell, C.R., Brunson, K.W., Robbins, J.C.: Cellular interactions in the metastatic process.
Prog. Clin. Biol. Res. 9, 237-244 (1976)

Olofsson, T., Gärtner, I., Olsson, I.: Separation of human bone marrow cells in density gradients of polyvinylpyrrolidone coated silica gel (Percoll).
Scand. J. Haematol. 24, 254-262 (1980)

Osmond, D.G., Miller, R.G., von Boehmer, H.: Characterization of immunoglobulin-bearing and other small lymphocytes in mouse bone marrow by sedimentation and electrophoresis.
J. Immunol. 114, 1230-1236 (1975)

Parrott, D.M.V., de Sousa, M.A.B.: Thymus dependent and thymus independent populations: origin, migratory patterns and lifespan.
Clin. Exp. Immunol. 8, 663-684 (1971)

Perper, R.J., Zee, T.W., Mickelson, M.M.: Purification of lymphocytes and platelets by gradient centrifugation.
J. Lab. Clin. Med. 72, 842-848 (1968)

Pertoft, H., Johnsson, A., Wärmegard, B., Seljelid, R.: Separation of human monocytes on density gradients of Percoll^{R}.
J. Immunol. Methods 33, 221-229 (1980)

Platsoucas, C.D., Galinski, M., Kempin, S., Reich, L., Clarkson, B., Good, R.A.: Abnormal T lymphocyte subpopulations in patients with B cell chronic lymphocytic leukemia: An analysis by monoclonal antibodies.
J. Immunol. 129, 2305-2312 (1982)

Pretlow, T.G., Pretlow, T.P.: Cell electrophoresis.
Int. Rev. Cytol. 61, 85-128 (1979)

Rabellino, E., Colon, S., Grey, H.M., Unanue, E.R.: Immunoglobulin on the surface of lymphocytes. I. Distribution and quantitation.
J. Exp. Med. 133, 156-167 (1971)

Rai, K.R., Sawitsky, A., Cronkite, E.P., Chanana, A.D., Levy, R.N., Pasternack, B.S.: Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. Blood 46, 219-234 (1975)

van der Reijden, H.J., van der Gaag, R., Pinkster, J., Rümke, H.C., van't Veer, M.B., Melief, C.J.M., von dem Borne, A.E.G.KR.: Chronic lymphocytic leukemia. Immunological markers and functional properties of the leukemic cells. Cancer 50, 2826-2833 (1982)

Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., Levey, R.H., Schlossman, S.F.: Discrete stages of human intrathymic differentiation: Analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1588-1592 (1980)

Robert, K.H., Garton, G., Möller, E., Nilsson, B.: Clinical significance of mitogen induced responses in lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. Acta Med. Scand. 207, 97-103 (1980)

Roelants, G.: Antigen recognition by B and T lymphocytes. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 59, 135-165 (1972)

Ruhenstroth-Bauer, G.: Cell electrophoresis. Churchill, London; p.66 (1965)

Sabolovic´, D., Sabolovic´, N., Dumont, F.: Identifikation of T and B cells in mouse and man. Lancet 2, 927 (1972)

Sabolovic´, D., Dumont, F., Sabolovic´, N., Chollet, P., Amiel, J.L.: Electrophoretic mobility of blood lymphocytes in patients with chronic lymphoid leukemia. Biomedicine 19, 222-227 (1973)

Sabolovic´, D., Dumont, F.: Separation and characterization of cell subpopulations in the thymus. Immunology 24, 601-606 (1973)

Salmon, S.E., Seligmann, M.: B-cell neoplasia in man. Lancet ii, 1230-1233 (1974)

Schaeffer, B.E., Schaeffer, H.E., Brick, I.: Cell electrophoresis of amphibian blastula and gastrula cells: The relationship of surface charge and morphogenetic movement. Dev. Biol. 34, 66-76 (1973)

Schroff, R.W., Foon, K.A., Billing, R.J., Fahey, J.L.: Immunologic classification of lymphocytic leukemias based on monoclonal antibody-defined cell surface antigens. Blood 59, 207-215 (1982)

Schubert, J.C.F., Walther, F., Holzberg, E., Pascher, G., Zeiller, K. : Preparative electrophoretic separation of normal and neoplastic human bone marrow cells.
Klin.Wschr. 51, 327-332 (1973)

Segal, A.W., Fortunato, A., Herd, T.: A rapid single centrifugation step method for the separation of erythrocytes, granulocytes and mononuclear cells on continuous density gradients of Percoll.
J. Immunol. Methods 32, 209-214 (1980)

Serrou, B., Thierry, C., Chollet, P., Chassagne, J., Sauvezie, B., Bidet,J.M., Plagne, R.: Difference in mitogen response and electrophoretic mobility of two T lymphocyte subpopulations.
Eur. J. Cancer 13, 361-365 (1977)

Singer, S.J., Nicolson, C.L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.
Science 175, 720-731 (1972)

Slease, R.B., Wistar, R., Scher, I.: Surface immunoglobulin density on human peripheral blood mononuclear cells.
Blood 54, 72-87 (1979)

Smith, B.A., Ware, B.R., Weiner, R.S.: Electrophoretic distributions of human peripheral blood mononuclear white cells from normal subjects and from patients with acute lymphocytic leukemia.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2388-2391 (1976)

Smith, B.A., Ware, B.R.: Apparatus and methods for laser Doppler electrophoresis.
Contemp. Top. Analyt. Clin. Chem. 2, 29-54 (1978)

Stathopoulos, G., Elliott, E.V.: Formation of mouse or sheep red blood cell rosettes by lymphocytes from normal and leukaemia individuals.
Lancet i, 600-601 (1974)

Stein, G.: Separation of human lymphoid cells by preparative cell electrophoresis. II. Free-flow electrophoretic separation of human blood cells.
Biomedicine 23, 5-11 (1979)

Steiner, R., Kaufmann, R., Hoffmann, W.: Technical aspects and new applications of automatic cell electrophoresis. In: Cell electrophoresis in cancer and other clinical research. Ed. Preece, A.W., Light, P.A.; Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, p.281 (1981a)

Steiner, R.: Laser Doppler Spektroskopie- Experimentelle Untersuchungen zu Einsatzmöglichkeiten in Biomedizinischer Forschung und Klinischer Diagnostik.
Verlag Dr. Peter Mannhold, Düsseldorf (1981b)

Stockdill, G., Dewar, A.E., Harrison, D.: Cell marker studies in patients with newly diagnosed chronic lymphatic leukaemia.
Scand. J. Haematol. 30, 59-67 (1983)

Stutman, O.: Two main features of T-cell development: Thymus traffic and postthymic maturation.
Contemp. Top. Immunobiol. 7, 1-46 (1977)

Stutman, O.: Intrathymic and extrathymic T cell maturation.
Immunol. Rev. 42, 137-184 (1978)

Thiel, E.: Monoclonal antibodies against differentiation antigens of lymphopoiesis.
Blut 47, 247-261 (1983)

Thomson, A.E.R., Mehrishi, J.N.: Surface properties of normal human circulating small lymphocytes and lymphocytes in chronic lymphocytic leukaemia: Separation, adhesiveness and electrokinetic properties.
Eur. J. Cancer 5, 195-206 (1969)

Ulmer, A.J., Flad, H.D.: Discontinuous density gradient separation of human mononuclear leucocytes using Percoll^{R} as gradient medium.
J. Immunol. Methods 30, 1-10 (1979)

Vassar, P.S., Kendall, M.J., Seaman, G.V.F.: Electrophoresis of human leucocytes.
Arch. Biochem. Biophys. 135, 350-355 (1969)

Vassar, P.S., Levy, E,M., Brooks, D.E.: Studies on the electrophoretic separability of B and T human lymphocytes.
Cell. Immunol. 21, 257-271 (1976)

Vitetta, E.S., Uhr, J.W.: IgD and B cell differentiation.
Immunol. Rev. 37, 50-88 (1977)

Wiig, J.N., Thunold, S.: Electrophoresis of lymphoid cells - characterization of human B and T cells in peripheral lymphoid tissues.
Clin. Exp. Immunol. 15, 497-506 (1973)

Wiig, J.N.: Effect of neuraminidase on lymphoid cells. Differences in structure of B and T cells and thymocytes of the mouse shown by cell electrophoresis and sialic acid determinations.
Scand. J. Immunol. 3, 357-363 (1974)

Wiig, J.N.: Electrophoresis of lymphoid cells. A study of Bruton type of agammaglobulinaemia, thymic dysplasia, chronic lymphatic leukemia and of normal human thymocytes.
Clin. Exp. Immunol. 19, 159-165 (1975)

Wiig, J.N.: Surface structures influencing the migration in-vivo (ecotaxis) of murine thymocytes, T and B cells.
Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. C 84, 59-67 (1976)

Wiltshaw, E.: Chemotherapy in chronic lymphocytic leukemia.
Clin. Haematol. 6, 223-235 (1977)

Yam, L.T., Li, C.Y., Crosby, W.H.: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes.
Am. J. Clin. Pathol. 55, 283-290 (1971)

Zeiller, K., Pascher, G., Wagner, H., Liebich, H.G., Holzberg, E., Hannig, K.: Distinct subpopulations of thymus-dependent lymphocytes. Tracing of the differentiation pathway of T cells by use of preparatively electrophoretically separated mouse lymphocytes.
Immunology 26, 995-1012 (1974)

Zeiller, K., Schindler, R.K., Liebich, H.G.: The T lymphocyte surface in development. A study of the elektrokinetic, antigenic and ultrastructural properties of T lymphocytes in mouse thymus and lymph nodes.
Israel. J. Med. Sci. 11, 1242-1266 (1975)

Zeiller, K., Pascher, G., Hannig, K.: B lymphocyte subpopulations in the mouse spleen. A study of the differentiation pathway using free-flow electrophoretically separated subpopulations of direct PFC progenitor cells.
Immunology 31, 863-880 (1976)

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. R. Steiner für die Überlassung des Themas und die stetige und geduldige Unterstützung bei der Erarbeitung.

An dieser Stelle sei auch Frl. Sabine Broschk für ihre Mithilfe bei zahlreichen Experimenten, Frl. Ulrike Brocke (Neurochemisches Labor der Neurologischen Klinik) für die Durchführung der Lymphozytenkulturen und Herrn Dr. Doxiadis (Abteilung für Immungenetik, Universität Essen) für die immunologische Zelltypisierung herzlichst gedankt, ebenso wie den Ärzten und Schwestern der 1. Medizinischen Klinik, der Personalärztlichen Abteilung und der Station K 10 der Kinderklinik der Universität Düsseldorf, durch deren stetige Bereitschaft und Hilfe das umfangreiche Untersuchungsmaterial beschafft werden konnte und damit die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht wurde.

Lebenslauf

Geburtsdatum	28.06.1958
Geburtsort	Columbus, Ohio; USA
1964 - 1967	1. - 3. Volksschuljahr in Connecticut, USA
1967 / 1968	4. Volksschuljahr in Wuppertal-Barmen
1968 - 1977	Carl Duisberg Gymnasium, Wuppertal
1977	Abitur
1977 - 1984	Medizinstudium an der Universität Düsseldorf
SS 1979	Ärztliche Vorprüfung
SS 1980	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
WS 1983	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
WS 1984	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. A. Hopf

Referent
gez.: Priv.-Doz. Dr. R. Steiner

Korreferent
gez.: Prof. Dr. J.T. Fischer

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353